

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Chemie



Lucie Pejšková

Vliv proteinu SGIP1 na partnery účastníci se signalizace
kanabinoidního receptoru 1

*Influence of protein SGIP1 on partners participating in signalization
of cannabinoid receptor 1*

Bakalářská práce

Školitel: Doc. MUDr. Jaroslav Blahoš, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Doc. MUDr. Jaroslava Blahoše, Ph.D a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 28. května 2019

.....

Lucie Pejšková

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli Doc. MUDr. Jaroslavu Blahošovi, Ph.D., že mi umožnil se podílet na zajímavém projektu a vždy mi poskytl odbornou pomoc a rady při vedení mé bakalářské práce. Dále jsem velice vděčná Mgr. Michaelle Dvořákové za trpělivý přístup a cenné rady, během psaní této práce. Děkuji také celému kolektivu Oddělení molekulární farmakologie Ústavu molekulární genetiky AV ČR v.v.i. za veškerou podporu, ochotu kdykoliv pomoci a skvělou atmosféru na pracovišti. V poslední řadě patří velké díky celé mé rodině, přátelům a příteli, bez jejichž neustálé podpory a trpělivosti by tato práce nikdy nemohla vzniknout.

Tato práce vznikla na oddělení Molekulární farmakologie Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České republiky v Praze. Byla finančně podpořena granty GAČR 16-24210S a GAČR 19-24172S.

Obsah

Seznam použitých zkratk	6
Abstrakt	8
Abstract	9
1 ÚVOD	10
1.1 Synaptický přenos, neuropřenašeče, neuromodulátory	10
1.2 Receptory spřažené s G-proteiny (GPCR)	11
1.2.1 Nitrobuněčný přenos signálu	12
1.2.1.1 Aktivace GPCR	12
1.2.1.2 G-proteiny	12
1.2.1.3 Extracelulárním signálem regulovaná kináza 1/2 (ERK1/2)	13
1.2.1.4 GPCR desenzitizace a internalizace	14
1.3 Kanabinoidní systém	15
1.4 Opioidní systém	17
1.5 Src Homology 3-Domain Growth Factor Receptor-Bound 2-Like (Endophilin) Interacting Protein 1 (SGIP1)	19
2 CÍL PRÁCE	21
3 MATERIÁL	22
3.1 Chemikálie, roztoky, pufr	22
3.2 Enzymy DNA rekombinantní technologie	24
3.3 Heterologní buněčná linie	24
3.4 Použitá DNA	24
3.5 CisBio ERK1/2 assay kit	25
3.6 Použité přístroje a materiál	25
4 METODY	26
4.1 DNA rekombinantní technologie	26
4.1.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů a DNA v roztocích	26
4.1.2 Štěpení restrikčními endonukleázami	26
4.1.3 Elektroforetická separace	26
4.1.4 Ligace	27

4.1.5 Transformace kompetentních bakterií <i>Escherichia coli</i>	27
4.1.6 Izolace a purifikace DNA.....	27
4.2 Sekvenování DNA.....	28
4.3 Pasáž buněk	28
4.4 Transfekce a stimulace buněk	29
4.5 Fosfo-ERK1/2	29
4.6 Měření internalizace receptorů	30
4.7 Statistické vyhodnocení dat.....	31
4.8 Příprava vzorků pro fluorescenční mikroskopii	31
4.9 Snímání obrázků fluorescenčním mikroskopem	32
5 VÝSLEDKY I.....	33
5.1 Vytvoření nových chimérních receptorů	33
5.2 Ověření exprese nových chimérních receptorů	36
5.3 Ověření funkčnosti nových chimérních receptorů	39
6 VÝSLEDKY II	40
6.1 Internalizace a ovlivnění signalizace CB1R proteinem SGIP1	40
6.1.1 Internalizace receptorů CB1R a MOR	40
6.1.2 Internalizace chimérních receptorů CB1R a MOR	40
6.2 Měření aktivity ERK1/2	41
6.2.1 Ovlivnění ERK1/2 signalizace CB1R, MOR proteinem SGIP1	41
6.2.2 Ovlivnění ERK1/2 signalizace chimérních variant CB1R proteinem SGIP1 ...	42
6.2.3 Ovlivnění ERK1/2 signalizace chimérních variant MOR proteinem SGIP1	43
7 DISKUZE	45
8 ZÁVĚR	47
9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	48
PŘÍLOHA	

Seznam použitých zkratk

%obj	objemové procenta
3I	označení třetí intracelulární smyčky receptoru
7TM	sedm-transmembránová doména
ADP	adenosindifosfát
AP-2	název komplexu proteinů (z angl. „assembly polypeptide 2“)
APA doména	z anglického „AP2 activator domain“
APS	peroxodisíran amonný (z angl. „Ammonium persulfate“)
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. „Fetal bovine serum“)
CB1R	kanabinoidní receptor 1
CB2R	kanabinoidní receptor 2
cGMP	cyklický guanosin monofosfát
C-konec	část polypeptidového řetězce zakončená karboxylovou skupinou
CNS	centrální nervová soustava
DAMGO	[D-Ala ² , MePhe ⁴ , Gly(ol) ⁵] enkefalin
DAPI	fluorescenční barvivo 4',6-diamidin-2-fenylindol
DMEM	médium pro kultivaci buněk „Dulbecco's Modified Eagle Medium“
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOR	<i>delta</i> (δ) opioidní receptor
DPSS	z anglického „Diode-pumped solide-state" laser
eps15	epidermální růstový faktor 15 (z angl. „Epidermal growth factor receptor substrate 15“)
ERK1/2	extracelulárním signálem řízená kináza 1/2 (z angl. „extracellular signal-regulated kinase“)
F-BAR	z anglického „Fer/Cip4 homology domain only-Bin/amphiphysin/Rvs“
FBS	fetální hovězí sérum
FCHO	z anglického Fer/Cip4 homology domain only
GDP	guanosindifosfát
GEF	guanine nucleotide-exchange factor
GFP	zelený fluorescenční protein (z angl. „Green fluorescent protein“)
GPCRs	receptory spřažené s G proteiny (z angl. „G-protein coupled receptors“)

GPR55	z anglického „G protein-coupled receptor 55“
G-protein	protein vázající guanosin di(tri)fosfát
GRK	kináza spřažená s G-proteiny
GTP	guanosintrifosfát
HBSS	název pufru (z angl. „Hank’s balanced salt solution“)
HEK293	lidské embryonální ledvinové buňky 293 (z angl. „human embryonic kidney cells“)
HTRF	z anglického „Homogeneous Time resolved fluorescence“
KOR	<i>kappa</i> (κ) opioidní receptor
LB	název média (dle Luria-Bertani)
M	molární koncentrace (mol/l)
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza (z angl. „mitogen-activated protein kinases“)
MOR	<i>mu</i> (μ) opioidní receptor
N-konec	část polypeptidového řetězce zakončená aminoskupinou
PBS	fosfátový pufr (z angl. „phosphate buffered saline“)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PCR _{H2O}	voda pro PCR
PPAR	peroxisomový proliferačně aktivovaný receptor (z angl. „Peroxisome proliferator-activated receptor“)
RNA	ribonukleotidová kyselina
SGIP1	z anglického „src Homology 3-Domain Growth Factor Receptor-Bound 2-Like (Endophilin) Interacting Protein 1“
THC	Δ ⁹ -tetrahydrokanabinol
tkH ₂ O	voda pro tkáňové kultury
TR-FRET	z anglického „time-resolved fluorescence resonance energy transfer“
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRPV1	vanilloidový/kapsaicinový receptor (z angl. „Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1“)
WIN	WIN 55,212-2; (R)-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)pyrrolo [1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenylmethanone mesylate
μHD	<i>mu</i> homologická doména

Abstrakt

Receptory spřažené s G-proteiny (GPCRs) představují největší rodinu receptorů na buněčném povrchu. GPCR jsou aktivovány endogenními nebo exogenními ligandy. Navíc GPCR patří mezi molekuly, na které cílí až čtvrtina používaných léčiv. Po aktivaci receptoru dochází k buněčné signalizaci, při které jsou do buňky přenášeny informace z vnějšího prostředí. Na základě těchto přenášených informací mohou v buňce probíhat odpovědi. Klíčovým poznatkem pro tuto práci je souhra kanabinoidní a opioidní signalizace *in vivo* na nitrobuněčné úrovni, která může mít fyziologické dopady¹.

Kanabinoidní a opioidní receptory patří do rodopsinové rodiny receptorů a jsou spřažené s $G_{ai/o}$ proteiny². Kanabinoidní receptor 1 (CB1R) a μ -opioidní receptor (MOR) se společně vyskytují v některých oblastech centrálního nervového systému (CNS) a sdílejí mnoho důležitých vlastností. Aktivace obou receptorů inhibuje aktivitu adenylátcyklázy, čímž snižuje hladinu cyklického adenosinmonofosfátu v buňce, a moduluje extracelulárním signálem řízenou kinázu 1 a 2 (ERK1/2)². S ohledem na bohaté biochemické, farmakologické a anatomické důkazy podporující existenci funkčního spojení při aktivaci příslušných receptorů kanabinoidy a opioidy³ se toto téma stalo zajímavým i pro naše bádání.

Naše předešlá studie popisuje interakci mezi proteinem SGIP1 a kanabinoidním receptorem 1 (CB1R)⁴. Po stimulaci agonistou, SGIP1 významně inhibuje internalizaci CB1R, a tím mění jeho signalizaci⁴. V případě MOR k inhibici internalizace proteinem SGIP1 nedochází. Z těchto výsledků můžeme odvodit, že internalizace CB1R je ovlivňována proteinem SGIP1 specificky, zatímco internalizaci MOR SGIP1 neovlivňuje, pravděpodobně díky rozdílné interakci SGIP1 s těmito receptory.

V této práci jsme proto pozorovali účinky proteinu SGIP1 na signalizaci obou receptorů, CB1R i MOR a jejich vytvořených chimérních verzí. Rekombinantní receptory, jsme sestrojili záměnou částí CB1R a MOR s cílem zmapování interakčních míst s proteinem SGIP1. U nově konstruovaných receptorů jsme sledovali ovlivnění jejich signalizační dráhy ERK1/2 proteinem SGIP1. Z výsledků této práce vyplývá, že SGIP1 ovlivňuje míru fosforylace ERK1/2 nejen pro signalizaci receptorem CB1, ale také MOR. Signalizace ERK1/2 je aktivovaná oběma studovanými receptory, či některými jejich chimérami. Domníváme se proto, že může být ovlivněna proteinem SGIP1 nespecificky.

Klíčové slova: GPCR; signální kaskáda; kanabinoidní receptor 1; SGIP1; ERK1/2; μ -opioidní receptor

Abstract

The G-protein-coupled receptor (GPCR) family represents the largest family of cell surface receptors. GPCRs are activated by endogenous or exogenous ligands, and are targets for more than a quarter of currently used drugs. Activation of receptors initiates intracellular signaling pathways. This way the membrane receptors transfer information from the outside environment into the cell. Based on the signal the cell can respond to the changes of the environment. Key observation important for this thesis is interplay of cannabinoid and opioid signaling *in vivo*, which can have significant physiological effects¹.

Cannabinoid receptor 1 (CB1R) and μ opioid receptor (MOR) belong to the rhodopsin family of receptors, and both are coupled with $G_{ai/o}$ proteins². Both are located in certain areas in central nervous system (CNS) and share a lot of important features. Activation of both of the receptors leads to inhibition of adenylyl cyclase, thus decreasing the level of cyclic adenosine monophosphate in the cell, and modulates extracellular regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2)². In view of the numerous anatomical, biochemical and pharmacological evidence supporting the existence of the functional interaction between opioid³ and cannabinoid receptor systems this topic became interesting for our research.

In our previous study we described interaction between SGIP1 and cannabinoid receptor 1 (CB1R)⁴. After agonist stimulation, SGIP1 significantly inhibits internalization and alters signalization of CB1R⁴. In case the of MOR, inhibition of the receptor internalization by protein SGIP1 does not occur. From these results we can deduce that internalization of CB1R is influenced by protein SGIP1 specifically, whereas MOR internalization is not affected by SGIP1 at all – presumably because of a different interaction of SGIP1 with these receptors.

In this thesis, we were observing effects of SGIP1 on signaling of both receptors (CB1R and MOR) and their created of chimera versions. Cloning of functional of expression chimeras vectors by combination of CB1R and MOR will be used for mapping of interaction places of the receptors with SGIP1. In newly created receptors, we observed influence of their function via protein SGIP1 by the signal pathway ERK1/2. Our results indicate that SGIP1 is influencing the level of phosphorylation in ERK1/2 not by signaling of receptor CB1, but also MOR. Signalization of ERK1/2 is activated by both studied receptors or their chimeras and is influenced by protein SGIP1 nonspecifically.

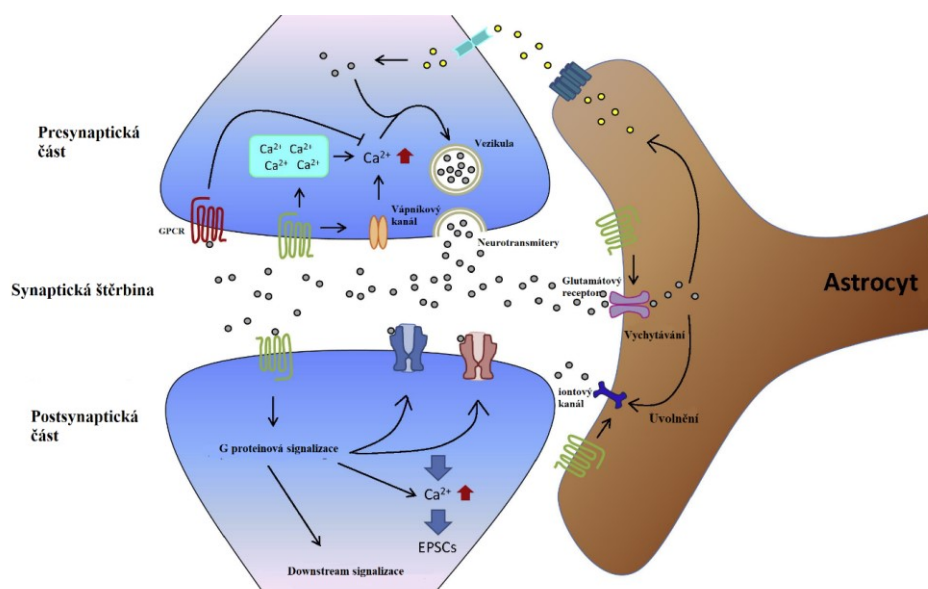
Key words: GPCR; signaling cascade; Cannabinoid receptor 1; SGIP1; ERK1/2; μ -opioid receptor

1 Úvod

1.1 Synaptický přenos, neuropřenašeče, neuromodulátory

Správná komunikace mezi neurony je klíčová pro fyziologické fungování nervového systému. Dysfunkce synaptického přenosu může být zdrojem neurologických a neuropsychiatrických onemocnění. Synapse je hlavní funkční jednotka, kde jsou signály putující podél axonů přenášeny do postsynaptických buněk. Synapse nejsou statické a mohou se měnit v závislosti na hladině jejich aktivity. Tuto vlastnost nazýváme synaptickou plasticitou⁵. Všechny funkce nervového systému, od jednoduchých reflexů až po paměť a vyšší kognitivní funkce, vycházejí ze správné činnosti nervových spojů⁶.

Synapse mají tři funkční oddíly: presynaptickou část, synaptickou štěrbinu a postsynaptickou část. Většina neurotransmiterů je uvolňována ze synaptických vezikul z presynaptické části. Uvolněné neurotransmitery difundují přes synaptickou štěrbinu a na postsynaptické membráně se molekuly neurotransmiterů váží na membránové receptory. Interakce neuropřenašečů s receptorem spouští postsynaptickou odpověď (Obr. 1). V závislosti na přenašeči a receptoru mohou být odpovědi buď excitační, nebo inhibiční.



Obr. 1 Synapse a synaptický přenos. Signalizace pomocí většiny neurotransmiterů spočívá v jejich uchovávání ve veziklech, řízené uvolňování do synaptické štěrbinu s následnou aktivací příslušných receptorů. Následně membránové receptory spouští odpověď. (Převzato a upraveno podle Huang 2015)⁷

1.2 Receptory spřažené s G-proteiny (GPCR)

Receptory mohou být klasifikovány podle umístění v buňkách na povrchové a intracelulární. Transmembránové povrchové receptory dělíme na ionotropní, metabotropní a receptory spojené s enzymatickou aktivitou⁸. Metabotropní receptory, které jsou největší a nejrozmanitější skupinou membránových receptorů v eukaryotách⁹ se většinou označují jako receptory spřažené s G-proteiny (GPCR z anglického „G-protein-coupled receptor“). Lidé mají 800 genů kódujících různé GPCR, každý z nich je specifický pro určitý signál¹⁰. Tyto receptory fungují jako příjemci pro informace ve formě světelné energie, peptidů, lipidů, sacharidů, bílkovin a dalších molekul, například farmak.

GPCR se dělí do rodin. Rodina A zahrnuje receptory podobné rodopsinu, rodina B receptory podobné sekretinu a rodina C pojímá metabotropní glutamátové/feromonové receptory¹¹. GPCR hrají roli v mnoha funkcích v lidském těle a zvýšené porozumění těmto receptorům výrazně ovlivnilo možnosti moderní medicíny. U některých GPCR je jejich funkce stále neznámá, stejně jako jejich přirozené endogenní ligandy. Tyto receptory jsou označovány jako „orphan“ GPCR neboli sirotčí.

GPCR se skládají z jediného polypeptidu a můžeme je zjednodušeně charakterizovat extracelulárním N-koncem, sedmi transmembránovými oblastmi a intracelulárním C-koncem. Extracelulární smyčky tvoří „kapsy“, kde se signalizační molekuly váží na GPCR. Jedna z možností převedení signálu z GPCR na nitrobuněčné kaskády se děje prostřednictvím G-proteinů. Rozlišujeme i různé typy heterotrimerních G-proteinů, které ovlivňují rozdílné efekty (viz Tab. 1).

Tab. 1 Typy heterotrimerních G-proteinů a jejich efekty

G-protein	Aktivovaná podjednotka	Efektor
G _s (stimulační)	α_s	Adenylátcykláza Ca ²⁺ kanál
G _i (inhibiční)	α_i	Adenylátcykláza K ⁺ kanál
	$\beta\gamma$	
G _q (fosfolipidový)	α_q	Fosfolipáza C
G _o	α_o i $\beta\gamma$	K ⁺ kanál a Ca ²⁺ kanál Fosfolipáza C
	$\beta\gamma$	
G _t (transducin)	α_t	cGMP-fosfodiesteráza

1.2.1 Nitrobuněčný přenos signálu

1.2.1.1 Aktivace GPCR

Každý receptor je funkčně spojen se specifickými buněčnými signálními dráhami, které vyvolávají odpovědi v buňce¹². GPCR mohou zaujmout několik konformací, které buď aktivují konkrétní signální dráhy, nebo jsou v klidovém stavu. Agonisté stabilizují aktivní konformaci, antagonisté blokují navázání jiných ligandů bez vlivu na konformaci receptoru. Inverzní agonisté pak stabilizují receptor v inaktivní konformaci a tím snižují bazální aktivitu receptoru danou samovolnou změnou konformace z neaktivní na aktivní.

Ortosterické ligandy se váží do místa působení přirozeného ligandu, s kterým soutěží o jeho obsazení. U CB1R a MOR jsou tato vazebná místa v hydrofobní kapse tvořené sedmi transmembránovými alfa-helixy. Alosterické ligandy se váží do jiné části receptoru. Podle funkce mohou být pozitivní, neutrální a inhibiční.

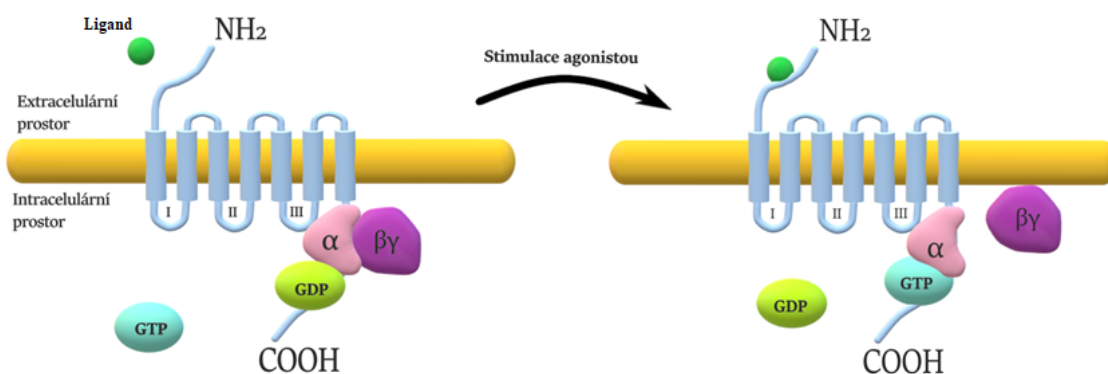
Některé ligandy stabilizují takovou konformaci receptoru, která preferenčně aktivuje určitou signální dráhu, či asociaci s dalšími molekulami. V tomto případě jde o tzv. biased ligands neboli funkčně selektivní ligandy.

1.2.1.2 G-proteiny

G-proteiny jsou složeny ze tří různých podjednotek *alfa*, *beta* a *gama*¹³. Podjednotka *alfa* G-proteinů váže buď GTP, nebo GDP v závislosti na tom, zda je protein aktivní (GTP) nebo neaktivní (GDP). Protein GEF je zodpovědný za přepínání mezi těmito stavy.

Aktivace G-proteinu vede k tomu, že podjednotky G-proteinu disociují na dvě části: podjednotku *alfa* vázanou na GTP a dimer *beta-gama*. Obě části mohou poté interagovat s jinými efektory, které se podílejí na přenosu signálu. Tento aktivní stav G-proteinů přetrvává, dokud nejsou jejich *alfa* podjednotky inaktivovány. V nepřítomnosti signálu, GTP je opět nahrazeno GDP, které se připojí k *alfa* podjednotce a celý komplex G-protein-GDP se váže na nedaleký GPCR. Tímto způsobem G-proteiny fungují jako spínač – zapnutý nebo vypnutý, v závislosti na interakci ligand-receptor na povrchu buňky (Obr. 2).

Specifické cíle pro aktivované G-proteiny zahrnují enzymy, které produkují druhé posly, a určité iontové kanály, jejichž propustnost je takto řízena. Signální cesty, které se aktivují pomocí GPCR jsou často propojené.



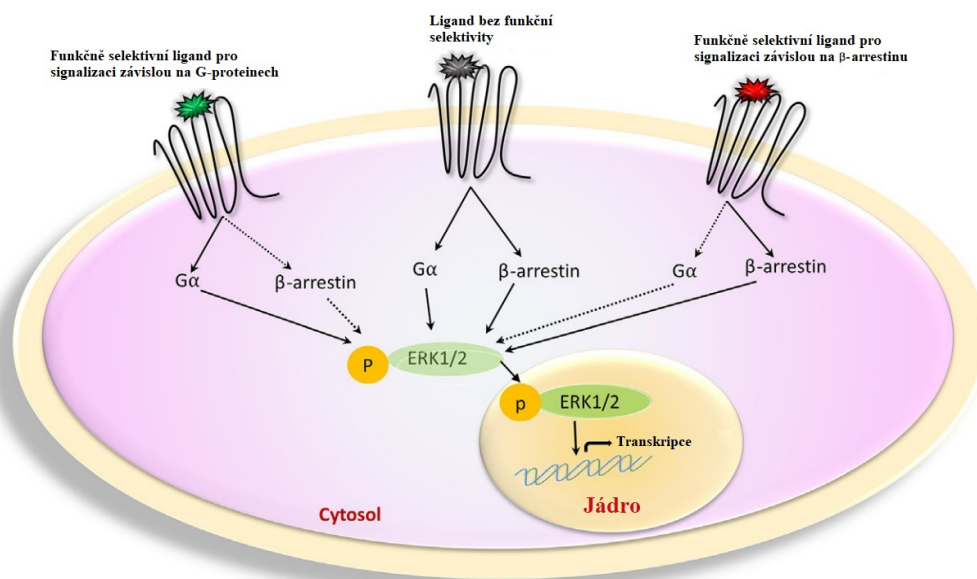
Obr. 2 Aktivace heterotrimerního G-proteinu. U nestimulovaných receptorů $G\alpha$ váže GDP. Po aktivaci receptorem dochází ke konformační změně a GTP nahrazuje GDP, což vede k disociaci $G\alpha$ a $G\beta\gamma$. $G\alpha$ i $G\beta\gamma$ pak mohou aktivovat další signální molekuly v buňce.

1.2.1.3 Extracelulárním signálem regulovaná kináza 1/2 (ERK1/2)

Jeden z hlavních buněčných efektorů aktivovaných GPCR je extracelulárním signálem regulovaná kináza 1/2 (ERK1/2). ERK1/2 jsou serin/threoninové proteinkinázy náležící do rodiny mitogenem aktivované protein kinázové (MAPK, z angl. „mitogen-activated protein kinases“) signální kaskády. U MAPK signální kaskády je aktivována několikastupňová fosforylační kaskáda, která zahrnuje aktivaci ERK1/2¹⁴. Pro plnou aktivitu ERK1/2 je nezbytná fosforylace tyrosinových a threoninových zbytků lokalizovaných v aktivační smyčce. Signalizace ERK1/2 poté může být součástí regulace široké škály buněčných procesů včetně proliferace, diferenciace, migrace, přežití, růstu a apoptózy¹⁵.

Signalizace pro určitý receptor prostřednictvím ERK1/2 může být způsobena jak aktivací G-proteinů, tak skrze β -arrestiny interagující s GPCR. Námi studované receptory mohou aktivovat dvě izoformy β -arrestinů¹⁶, β -arrestin1 a β -arrestin2. Strukturní studie odhalily dvě hlavní konformace komplexu GPCR a β -arrestinu: konformaci „ocasů“, s primárně vázaným β -arrestinem na fosforylovaném C-konci GPCR a „jádrovou“ konformaci, kde se β -arrestin spojuje s receptorovým transmembránovým jádrem¹⁷. Cahill a kol. ve své práci ukazují, že konformace „ocasů“ u β -arrestinu je klíčová pro zprostředkování internalizace receptoru a signalizaci prostřednictvím β -arrestinů, ale neovlivňuje desenzitizaci G-proteinové signalizace¹⁷.

Jak už bylo zmíněno dříve, funkčně selektivní ligandy aktivují preferenčně specifickou signalizaci závislou buď na G-proteinech, nebo β -arrestinech¹⁸ (Obr. 3). Signalizace závislá na β -arrestinech však nemůže být aktivována, pokud nepředchází aktivace G-proteinů¹⁹.

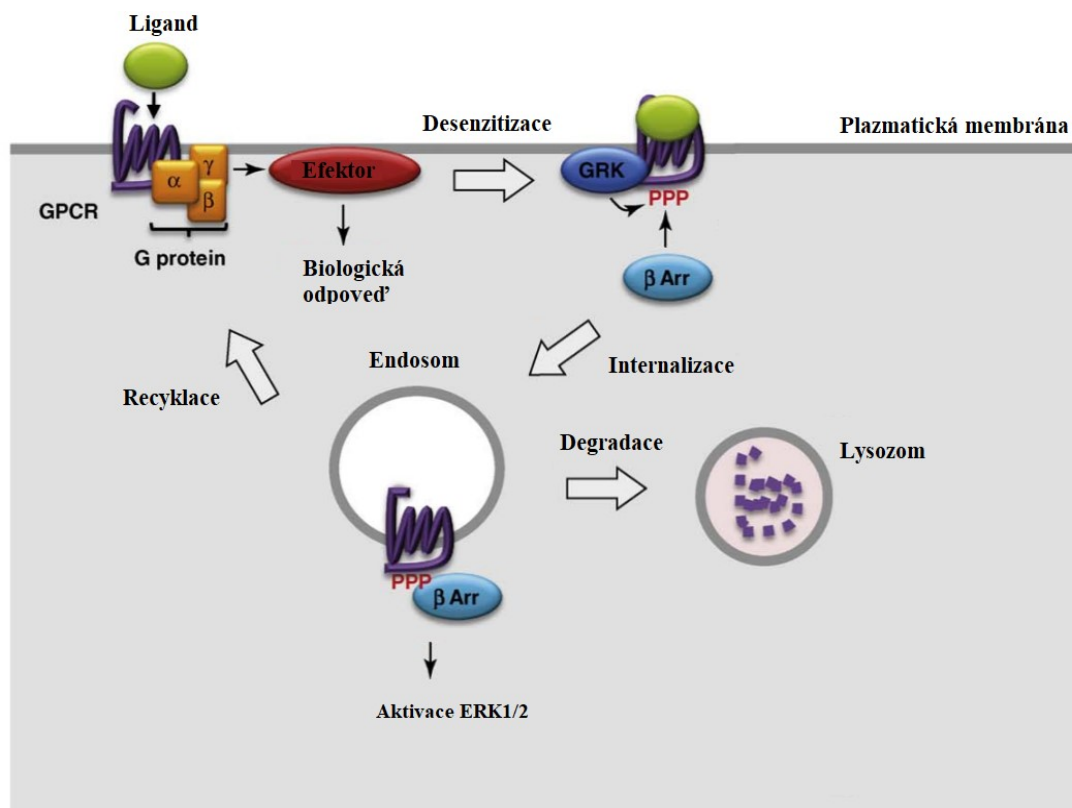


Obr. 3 Signalizace GPCR ovlivněná funkčně selektivními ligandy. Po stimulaci ligandem dochází k aktivaci jak G-proteinů, tak β -arrestinů. Funkčně selektivní ligand pro signalizaci závislou na G-proteinech (zelený) přednostně aktivuje signální dráhu ERK1/2 zprostředkovanou G-proteiny a funkčně selektivní ligand pro signalizaci závislou na β -arrestinech (červený) aktivuje signální dráhu ERK1/2 zprostředkovanou β -arrestinem. Tečkované šipky označují částečně inhibovaný či neupřednostňovaný způsob aktivace ERK1/2. (Převzato a upraveno podle Jain a kol. 2018)¹⁴

1.2.1.4 GPCR desenzitizace a internalizace

Spouštěčem pro internalizaci receptoru je konformační změna vyvolaná navázáním agonisty, který kromě iniciování G-proteinové signalizace, také aktivuje receptorové kinázy spojené s G-proteiny (GRK). GRK se vážou na receptor a fosforylují intracelulární zbytky serinu a threoninu umístěné ve třetí intracelulární smyčce nebo na C-konci receptoru²⁰. Poté na tento fosforylovaný receptor následuje vazba β -arrestinů, které hrají hlavní úlohu jak při rychlé desenzitizaci, tak při internalizaci receptorů. Na jedné straně tedy β -arrestiny soutěží s G proteiny o vazbu na receptor, což vede k desenzitizaci signálu. Na druhé straně podporují internalizaci receptoru pomocí endocytózy zprostředkované klatrinem prostřednictvím interakce s dalšími látkami, jako je řetězec klatrinu nebo klatrinový adaptorový proteinový komplex AP-2²¹. β -arrestinový C-konec se váže přímo ke klatrinu a komplexu AP-2, a tím tvoří pomocný skelet vedoucí k odstranění desenzitizovaných receptorů z buněčného povrchu prostřednictvím endocytózy zprostředkované klatrinem. Pro oddělení váčků potažených klatrinem od plazmatické membrány je zapotřebí bílkoviny zvané dynamin²². Po internalizaci mohou receptory v endosomech pokračovat v signalizaci, a tímto způsobem aktivovat

signalizační dráhu ERK1/2²³. Receptory mohou být následně degradovány v lysozomech nebo recyklovány zpět na buněčný povrch²² (Obr. 4).



Obr. 4 Signalizace GPCR může nastat během endocytického procesu. Aktivované GPCR podléhají fosforylaci prostřednictvím GPCR kináz. Fosforylované GPCR vážou β -arrestiny, které zabraňují jejich další interakci s G-proteiny, a také zprostředkovávají jejich endocytózu. Receptory v endosomech se mohou disociovat od β -arrestinu a vrátit se na buněčný povrch, nebo alternativně mohou podstoupit úplnou degradaci v lysozomu. Převzato a upraveno podle Celebiri 2010²⁴.

1.3 Kanabinoidní systém

Kanabinoidní systém u savců sestává z kanabinoidního receptoru 1 (CB1R), který je hojně exprimován v CNS²⁵, kanabinoidního receptoru 2 (CB2R), reprezentovaného zejména v periferních tkáních, jako je například imunitní systém, a z jejich ligandů – endokanabinoidů a enzymů zodpovědných za syntézu a degradaci endokanabinoidů²⁶. Aktivace CB1R vede k inhibici adenylátcyklázy, Ca^{2+} kanálů a také k aktivaci K^+ kanálů a MAPK přes $\text{G}_{\alpha/\text{o}}$ proteiny². Kanabinoidní ligandy mohou aktivovat i jiné receptory, například peroxisomový proliferačně aktivovaný receptor (PPAR, z angl. „Peroxisome proliferator-activated receptor“), vanilloidový/kapsaicinový receptor (TRPV1 z angl. „Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1“) nebo GPR55²⁷. Nejběžnější ligandy působící na kanabinoidní systém shrnuje Tab.2.

Tab. 2 Příklady kanabinoidních ligandů podle vazby ligandu

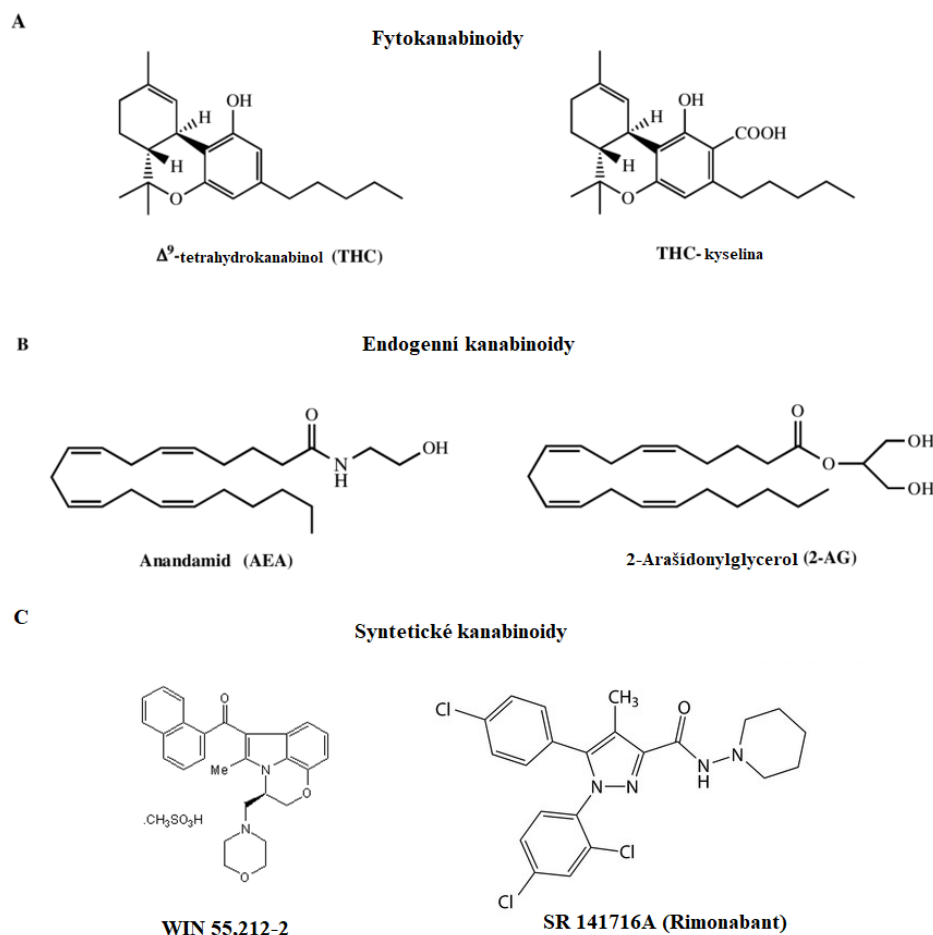
Modulátory	Příklady ligandů	
Ortosterické²⁸		
	Endogenní kanabinoidy	Anandamid neboli N-arašídonylethanolamid 2-arašídonylglycerol
	Fytokanabinoidy	Kanabinol Trans-(-)-delta-9-tetrahydrokanabinol (THC)
	Syntetické kanabinoidy	WIN 55,212-2 Rimonabant (SR141716)
Alosterické²⁹		
	Endogenní	Pregnenolon
	Fytokanabinoidy	Kanabidiol
	Syntetické	ORG27569

Syntetické kanabinoidy mají mnohdy odlišnou chemickou strukturu od endokanabinoidů či fytokanabinoidů (Obr. 5), a i přesto vyvolávají podobné účinky. Například WIN 55,212-2 je derivátem aminoalkylindolu a zároveň plným agonistou CB1R.

Endokanabinoidy nejsou shromažďovány ve váčcích jako typické neuropřenašeče, ale jsou syntetizovány dle potřeby. V mozku aktivují především receptory na presynaptické membráně. Po vazbě endokanabinoidu na receptor může dojít k metabolizaci nebo zpětnému vychytání ze synapse. Tím, že endokanabinoidní systém moduluje synaptický přenos v mnoha oddílech nervového systému, ovlivňuje různorodé procesy jako je paměť, nálada, vnímání bolesti a dále se podílí na regulaci energetické homeostázy, včetně stimulace chuti k jídlu. Během hladovění se koncentrace endokanabinoidů v těle zvyšují a při příjmu potravy klesají³⁰.

Farmakologické ovlivnění CB1R tedy může být využité u odblokování posttraumatického syndromu, regulace příjmu potravy a zvládání některých bolestivých stavů. Aktivace CB1R je však také doprovázena vedlejšími účinky, které se mohou projevit psychickými a neurologickými poruchami nebo potenciální závislostí³¹. Příkladem může být syntetický kanabinoid rimonabant, který je antagonistou CB1R a byl vyvinut jako lék proti nadváze. Lék byl stažen z trhu poté, co se objevily jeho vedlejší

účinky — úzkostné stavy a deprese³². Nyní většina léků dostupných na trhu na bázi kanabinoidů jsou deriváty THC (Δ^9 -tetrahydrokanabinol), předepisované na anorexii a zvracení spojené s chemoterapií. Nové léky se snaží docílit lepších terapeutických potenciálů s potlačením vedlejších účinků.



Obr. 5 Struktura některých ortosterických kanabinoidních ligandů. (A) Fytokanabinoidy, které lze nalézt v rostlině *Cannabis Sativa* (B) Endogenní kanabinoidy přirozeně se vyskytující v lidském těle. (C) Syntetické kanabinoidy.

1.4 Opioidní systém

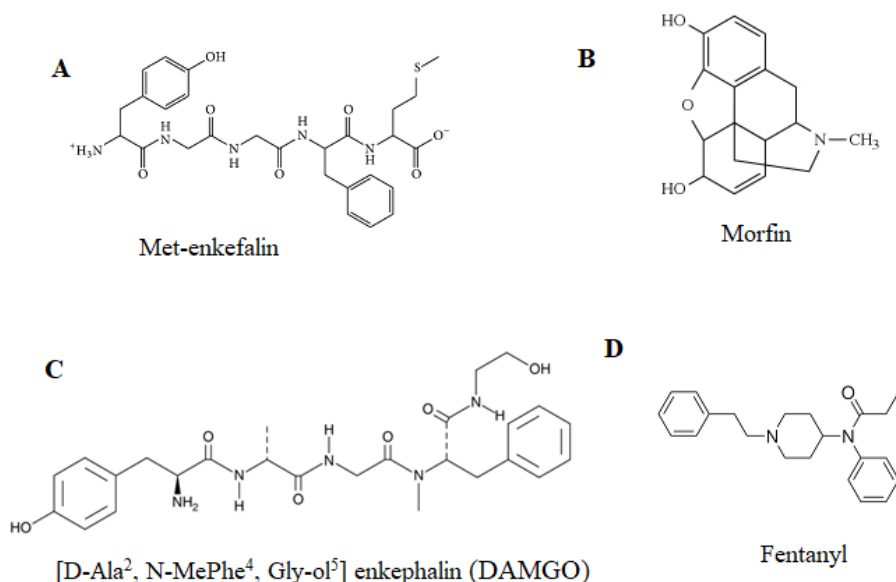
Stejně jako receptory pro kanabinoidy, opioidní receptory patří do rodopsinové rodiny GPCR a jsou spřaženy s třídou $G_{ai/o}$ proteinů. Kanabinoidní i opioidní receptory jsou umístěny především v presynaptických zakončeních. Jejich signalizace je funkčně propojena a bylo prokázáno, že mohou vytvářet funkční heterodimery².

Opioidní systém zahrnuje tři typy opioidních receptorů, *mu* (MOR), *delta* (DOR) a *kappa* (KOR)²⁵ a jejich endogenní ligandy². *Mu* a *delta* opioidní antagonisté mohou způsobovat euforii a pozitivní pocity, u *kappa* agonisty lze pozorovat dysforii a negativní

pocit³³. Opium získané z rostliny *Papaver somniferum* obsahuje vysoké koncentrace morfinu, kodeinu a thebainu³⁴. Jejich analgetické působení je využíváno pro zvládání vážných bolestivých stavů, avšak jsou spojeny i s mnoha nežádoucími efekty, jako je například vznik tolerance a závislosti.

Opioidní ligandy jsou krátké řetězce aminokyselin. Tyto neuropeptidy jsou syntetizovány z několika hlavních prekurzorových proteinů — proenkefalin, prodynorfin, proopiomelanokortin a β -lipotropin³⁴. Z těchto prekurzorů je odvozeno více než 20 opioidních ligandů³⁵. Mezi ně patří endorfin, enkefalin, dynorphin a další endogenní opioidy.

Ligandy endogenního opioidního systému a opioidní receptory se nachází v CNS a jsou také přítomny v několika periferních tkáních³⁴. Endogenní opioidy modulují vnímání bolestivých podnětů a reakce na tyto stimuly. Regulují ovšem také vitální funkce, jako je hlad a žízeň, dále se podílejí na kontrole nálady, imunitní odpovědi a dalších procesech. Dřívější studie prováděné s endogenními opioidy byly komplikovány rychlou enzymatickou degradací. Nicméně substituce D-aminokyseliny v poloze 2, typicky D-Ala, výrazně zvýšila jejich stabilitu³⁴. Od té doby bylo syntetizováno velké množství opioidních peptidů s výraznými rozdíly v selektivitě a farmakologické vazbě na receptory³⁴. Jedni z nejdůležitějších jsou [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly-ol⁵] enkefalin (DAMGO) a fentanyl, kteří jsou agonisté MOR (Obr. 6).



Obr. 6 Stručný přehled ligandů mu-opioidního systému. A) Met-enkefalin, jedna z forem vznikající z prekurzoru proenkefalinu. B) Morfin, látka získaná z opia. C) DAMGO byl syntetizován jako stabilní biologický analog endogenních opioidů leu- a met-enkefalinu. Má vysokou specifitu k μ -opioidnímu receptoru. D) Fentanyl je syntetický agonista opioidního receptoru s vyšším účinkem než morfin, ale kratším biologickým poločasem rozpadu.

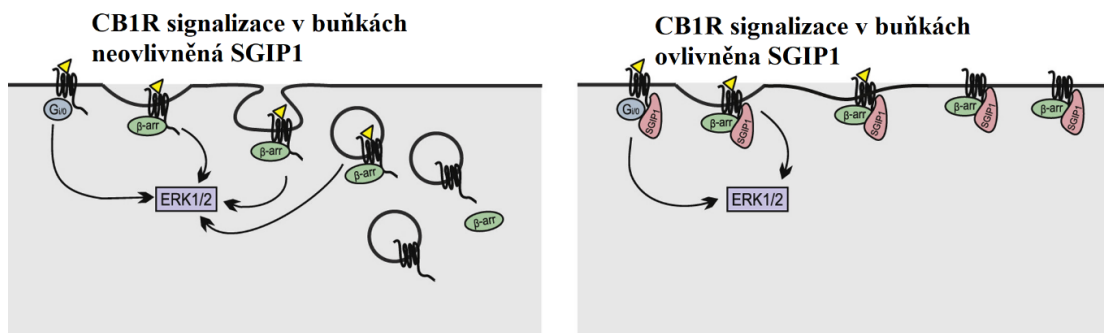
1.5 Src Homology 3-Domain Growth Factor Receptor-Bound 2-Like (Endophilin) Interacting Protein 1 (SGIP1)

SGIP1 (z anglického „SH3 domain GRB2 like endophilin interacting protein 1“) je endocytický protein, který byl poprvé studován v souvislosti s tím, že ovlivňuje energetickou homeostázu. Nadměrná exprese tohoto proteinu v hypothalamu vede k obezitě³⁶.

Tento intracelulární neuronální protein je lokalizovaný převážně na synapsích v axonálních zakončeních³⁶. CB1R a SGIP1 tedy mají podobnou distribuci v neuronech. SGIP1 je tvořen několika doménami: N-koncové MP (z angl. „membrane phospholipidic-binding“) domény, AP-2 aktivační domény (APA, z angl. „AP2 activator motif“), střední domény bohaté na prolin a C-koncové *Mu* homologické domény (μ HD)³⁷. APA doména, doména bohatá na prolin a C-koncová μ HD hraje roli při zprostředkování interakce mezi SGIP1 a dalšími proteiny³⁷. SGIP1 v klatrinem potažených jamkách přímo interaguje s fosfoinositidy, AP-2, Eps15, a dalšími adaptorovými proteiny³⁸. Interakci s CB1R zprostředkovává C-konec SGIP1, pravděpodobně v dimerické formě³⁷.

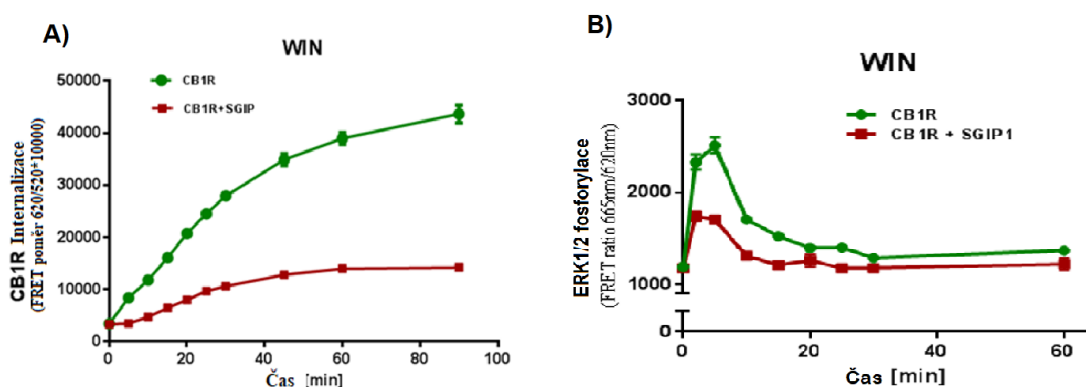
SGIP1 spolu s FCHo1/2 (z angl. „Fer/Cip4 homolog domain only“) patří do rodiny muniscinů. I přesto, že SGIP1 a FCHo1/2 sdílejí sekvenční homologii a podobné doménové uspořádání, FCHo1/2 proteiny jsou iniciátory procesu zakřivování plazmatické membrány a formování vznikajících klatrinových váčků, ale SGIP1 tomuto procesu brání⁴. Odlišnost proteinů SGIP1 a FCHo1/2 je nejvýraznější v N-koncové části⁴. Oproti SGIP1, které má již zmíněnou MP doménu, FCHo1/2 má na tomto konci F-BAR doménu³⁷ (z angl. „Fer/Cip4 homolog domain only-Bin/amphiphysin/Rvs“). Právě tento rozdíl je možná klíčový pro rozdílnou funkci v endocytóze.

SGIP1 ovlivňuje endocytózu zprostředkovanou klatrinem³⁹, a to pravděpodobně v počátečních fázích tohoto procesu interakcí s proteiny, jako například AP-2, intersectinem či Eps15. Některé tyto proteiny se také vážou s β -arrestiny, které dále mohou nepřímo interagovat s adaptorovými proteiny, přičemž SGIP1 by fungoval jako propojovací regulační prvek. Je také pravděpodobné, že SGIP1 může vytěsnit proteiny FCHo1/2, a tím ovlivňovat průběh endocytózy.



Obr. 7 *SGIP1 interagující na cytoplazmatické membráně zabraňuje endocytóze. (Upraveno podle A. Hajková a kol. 2016)⁴*

Dle našich poznatků SGIP1 brání internalizaci CB1R z buněčného povrchu (Obr. 7). Tím nedochází k odloučení β -arrestinu2, který je podmíněný internalizací a tím SGIP1 způsobuje, že β -arrestin2 je více asociován s CB1R⁴. SGIP1 také negativně ovlivňuje signální dráhu ERK1/2⁴, kdy snížená odpověď signální dráhy ERK1/2 v přítomnosti SGIP1 je právě v důsledku zamezení internalizace receptoru a jeho potenciální signalizace z endosomů (Obr. 7 a 8).



Obr. 8 *SGIP1 ovlivňuje signalizaci CB1R. A) Internalizace CB1R ovlivněná proteinem SGIP1, stimulovaného plným agonistou WIN 55212-2. B) CB1R s proteinem SGIP1 dosahuje nižších hodnot fosforylace ERK1/2 při stimulaci plným agonistou WIN 55212-2. (Upraveno podle A. Hajková a kol.)⁴*

SGIP1 moduluje signalizaci receptoru CB1 dráhově specifickým způsobem. Zatímco signalizace CB1R zprostředkovaná přes β -arrestiny je ovlivněná proteinem SGIP1, na signalizaci receptoru zprostředkovanou G-proteiny nemá vliv⁴. To může být způsobeno tím, že signalizace zprostředkovaná G-proteiny je regulována desenzitizací, tedy fosforylací receptoru, nebo G-proteinová signalizace probíhá z buněčného povrchu srovnatelně jako z endosomů po internalizaci.

2 Cíl práce

Práce je součástí projektu, který má za cíl mapování interakčních míst CB1R s proteinem SGIP1. Protein SGIP1 ovlivňuje internalizaci CB1R, avšak má minimální vliv na MOR. MOR se, tak jako CB1R, vyskytuje v presynapsích, a navíc funkčně i fyzicky interagují s CB1R, což má mnohé fyziologické dopady. Oba receptory navíc aktivují podobné nitrobuněčné signální kaskády. Proto jsme se rozhodli vytvořit sérii chimérních receptorů mezi CB1R a MOR a sledovat jejich potenciální interakci se SGIP1.

V této práci představujeme tvorbu a charakterizaci chimérních receptorů mezi CB1R a MOR a jejich ovlivnění proteinem SGIP1. První část práce je zaměřena na vytvoření nových chimérních receptorů s použitím rekombinantní DNA technologie, ověření jejich exprese a lokalizace v buňkách a ověření jejich funkčnosti. Druhá část práce má za cíl pozorovat vliv proteinu SGIP1 na receptory a jejich chimérní verze sledováním míry aktivace ERK1/2.

3 Materiál

3.1 Chemikálie, roztoky, pufry

Agaróza	Sigma-Aldrich, USA
(D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , Gly-ol ⁵) enkephalin (DAMGO)	Tocris R&D, USA
Ampicilin	Sigma-Aldrich, USA
CalPhos™ Mammalian Transfection Kit	Clontech laboratories, Inc., USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, USA
Dulbeccos modified Eagle's medium-high glucose medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol 96%	Penta, ČR
Ethidium bromid	Top Bio, ČR
Fetální hovězí sérum (FBS)	Invitrogen, USA
Fluoroshield™ with DAPI	Sigma-Aldrich, USA
Hovězí sérový albumin (BSA) 10 mg/ml	New England Biolabs, VB
Chlorid vápenatý (2M CaCl ₂)	Clontech laboratories, Inc., USA
Izopropanol 99%	Sigma-Aldrich, USA
Lipofectamin® 2000	Invitrogen, USA
Luria-Bertani agar	Média, ÚMG
Médium OPTI-OMEM (1X)	Thermo Fisher Scientific, USA
Paraformaldehyd 32%	Sigma-Aldrich, USA
PBS (1X)	Média, ÚMG
PCR H ₂ O	Top Bio, ČR
Peroxodisíran amonný (APS) 98%	Serva, Německo
Phospho-ERK (Thr202/Tyr204) cellular assay kit	Cisbio Bioassays, Francie
Poly-L-lysine hydrobromid	Sigma-Aldrich, USA
Poly-L-ornitin (0,01%, 10x koncentrovaný)	Sigma-Aldrich, USA
Proteinový standard molekulových hmotností	Thermo Fisher Scientific, USA
SNAP-surface 549	New England Biolabs, VB
SNAP-surface 649	New England Biolabs, VB
Standard velikosti DNA (GeneRuler 1 kb Plus)	Thermo Fisher Scientific, USA
DNA Ladder 250 bp - 10 000 bp)	
Triton(R) X-100 (10%)	Serva, Německo

Trypsin (2,5%)	Gibco, USA
WIN 55,212-2 mesylát	Tocris R&D, USA
YT microbial medium (Y2T)	Sigma-Aldrich, USA

Tab. 3 Použité pufrы

Název	Složení	Výrobce
<i>T4 DNA ligační pufr (10X)</i>	400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7.8	Thermo Fisher Scientific, USA
<i>Restrikční pufr 1</i>	0,1 M bis-Tris-propan-HCl, 0,1 M MgCl ₂ , 10 mM DTT, pH 7.0	New England Biolabs, VB
<i>Restrikční pufr 2</i>	Restrikční pufr 2 (0,5 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M MgCl ₂ , 10 mM DTT, pH 7.9	New England Biolabs, VB
<i>Restrikční pufr 3</i>	0,1 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, 0,1 M MgCl ₂ , 10 mM DTT, pH 7.9	New England Biolabs, VB
<i>Tris-acetátový pufr s EDTA (pufr TAE)</i>	40 mM Tris, 20 mM octová kyselina, 1 mM EDTA, pH 8,4	Thermo Fisher Scientific, USA
<i>Pufr QG</i>	složení výrobcem neuvedeno	QIAGEN, Německo
<i>Pufr PE</i>	složení výrobcem neuvedeno	QIAGEN, Německo
<i>Pufr pro izolaci DNA P1</i>	50 mM Tris, 20 mM Na ₂ EDTA.2H ₂ O, 0,1 mg/ml RNAza A, pH 8.0	QIAGEN, Německo
<i>Pufr pro izolaci DNA P2</i>	0,2 M NaOH, 1% SDS	QIAGEN, Německo
<i>Pufr pro izolaci DNA P3</i>	1 M octan draselný, pH 5.5	QIAGEN, Německo
<i>Pufr pro izolaci DNA QC</i>	1 M NaCl, 50 mM MOPS, 15%obj. isopropanol, pH 7.0	QIAGEN, Německo
<i>Pufr pro izolaci DNA QF</i>	1,25 M NaCl, 50 mM, 15%obj. isopropanol, pH 8.5	QIAGEN, Německo
<i>2X HBSS</i>	0,14 M NaCl; 5 mM KCl; 1 mM CaCl ₂ ; 0,4 mM MgSO ₄ · 7H ₂ O; 0,5 mM MgCl ₂ · 6H ₂ O; 0,3 mM Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O; 0,4 mM KH ₂ PO ₄ ; 6 mM glukóza; 4 mM NaHCO ₃ ; pH 7.4	Clontech laboratories, Inc., USA

3.2 Enzymy DNA rekombinantní technologie

Tab. 4 zobrazuje přehled všech použitých enzymů. Všechny sekvence jsou uvedené od 5' do 3' konce.

Tab. 4 Použité enzymy pro DNA rekombinantní technologie

Název	Rozpoznávaná sekvence	Jednotka	Výrobce
<i>Ligáza T4</i>		1 U/μl	Thermo Scientific, USA
<i>EcoRV</i>	GAT/ATC	20 U/μl	New England BioLabs, VB
<i>EcoNI</i>	CCTNN/NNNAGG	10 U/μl	New England BioLabs, VB
<i>BspEI</i>	T/CCGGA	10 U/μl	New England BioLabs, VB
<i>XhoI</i>	C/TCGAG	20 U/μl	New England BioLabs, VB
<i>BsrGI</i>	T/GTACA	10 U/μl	New England BioLabs, VB
<i>SacI</i>	GAGCT/C	20 U/μl	New England BioLabs, VB
<i>NsiI</i>	ATGCA/T	10 U/μl	New England BioLabs, VB

3.3 Heterologní buněčná linie

Buněčná linie HEK293T/17 (dále uváděny jen jako HEK293, buněčná linie odvozená od lidských embryonálních ledvinových buněk s integrovaným SV40 T-antigenem, klon 17; ATTC, Rockefeller University, USA)

3.4 Použitá DNA

Pro potřeby klonování byl použit pBluescript.

Všechny konečné konstrukty byly vytvořeny v expresním vektoru pRK5 (BD PharMingen, USA)

SGIP1 cDNA, myš (True-Clones; Origene Technologies, Inc., USA)

Expresní vektor pro Snap-CB1R poskytla firma CisBio Bioassays (Francie).

Expresní vektor pro CB1R byl darován profesorem Kenem Mackie (Indiana University, Bloomington, Indiana, USA).

Syntetizované sekvence pro třetí intracelulární smyčky dodané v pBluescript (GenCust, Německo)

3.5 CisBio ERK1/2 assay kit

Komerční sada pro provedení fosfo-ERK1/2.

Obsah komerční sady:

- Phospho-ERK1/2 protilátka s navázaným kryptátem
- Phospho-ERK1/2 d2 protilátka
- Kontrolní lyzát
- Blokovací pufr (100X)
- Lyzační pufr (4X)
- Detekční pufr

3.6 Použité přístroje a materiál

12-jamkové destičky	Greiner BioOne, Německo
384-jamkové destičky	Greiner BioOne, Německo
96-jamkové destičky	Greiner BioOne, Německo
Aparatura pro horizontální elektroforézu	Biotech, Velká Británie
Centrifuga Mikro 120 (Rotor 1212)	Hettich Zentrifugen, Německo
EVE automatické počítadlo buněk	Ultra-Lum, USA
Inkubátor 4000 series	Telstar, Španělsko
Laminární box Telstar Bio-II-A	Contherm Scientific, Nový Zéland
Mikroskop CKX41	Olympus, Japonsko
Přístroj pro detekci fluorescence Mithras LB 940	Berthold, Německo
Spektrofotometr Nanodrop ND 1000	Thermo Fisher Scientific, USA
Třepačka Orbi Safe TS	Schoeller, ČR
Přístroj pro detekci UV záření Universal Hood II	Bio-Rad Laboratories, USA
Gel Doc System	
Vodní lázeň TW12	Julabo, Německo
Konfokální mikroskop TCS SP5 AOBS Tandem	Leica, Německo

4 Metody

Pokud není uvedeno jinak, metody jsou prováděné podle protokolů dodávaných se zakoupenými chemickými sadami. Dále proto budou uváděny jen stručné postupy a případné změny v nich. Pokud není uvedeno jinak experimenty probíhaly za laboratorní teploty 22 ± 2 °C.

4.1 DNA rekombinantní technologie

4.1.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů a DNA v roztocích

Koncentrace DNA a proteinu v roztoku byla určována spektrofotometricky. Prostřednictvím přístroje Nanodrop ND 1000 byla měřena koncentrace v roztoku vzorků při vlnové délce 260 nm/280 nm.

4.1.2 Štěpení restrikčními endonukleázami

Restrikční štěpení je proces, při kterém je DNA štěpena restrikčními enzymy na specifických místech daných sekvencí nukleotidů. Tato metoda se používá pro přípravu DNA fragmentu pro následné klonování. Reakce se inkubuje při specifické teplotě potřebné pro optimální aktivitu restrikčního enzymu. Proces restrikčního štěpení může být vyhodnocen pomocí gelové elektroforézy.

Vektory byly štěpeny v celkové reakční směsi 30 µl. Jako pufr byl použit doporučený komerční restrikční pufr NEB 1-4 vybraný na základě zvolených enzymů. Samotný proces štěpení probíhal 2-3 hodiny v inkubátoru při 37 °C.

4.1.3 Elektroforetická separace

Pro ověřování a konstrukci nových plazmidů byla použita metoda elektroforetické separace, která umožňuje rozdělit fragmenty DNA dle jejich různé velikosti tím, že větší molekuly migrují pomaleji. Elektroforéza zahrnuje elektrické pole, toto pole je aplikováno tak, že jeden konec gelu má kladný náboj a druhý konec náboj záporný. Jelikož DNA jsou záporně nabitě molekuly, budou směřovány k pozitivně nabitě elektrodě. Analyzované molekuly migrují tímto elektrickým polem přes gel, který obsahuje malé póry. Molekuly procházejí gelem rychlostí, která je nepřímě úměrná jejich velikosti.

Příprava gelu spočívala v navázení agarózy, a to většinou pro 1% gel, tedy 100 ml TAE pufru odpovídalo 1 g agarózy a 1 µl ethydiumbromidu. Jamky agarózového gelu,

ponořené do TAE pufru byly naplněny reakční směsí DNA (5 µl) a nanášecího pufru (1 µl). Pro určení velikosti DNA byl nanesen standard velikosti DNA (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder 250 bp - 10 000 bp). Elektroforéza poté probíhala za konstantního napětí 90 V v rozmezí 15–40 minut v závislosti na velikosti fragmentů. Vizualizace elektroforetogramu probíhala pod UV transluminátorem (Universal Hood II Gel Doc Systém).

4.1.4 Ligace

Ligace byla prováděna v celkovém objemu 20 µl. Pomocí kalkulatoru, který je dostupný na webových stránkách firmy New England BioLabs (dostupné z <http://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>), byl vždy určen poměr pro vektor a insert vložený do ligace. Poměr byl zvolen vždy 1:5. Reakční směs byla dále tvořena 3 µl T4 ligačního pufru a 1 µl ligázy T4. Směs byla doplněna PCRH_2O do celkového objemu. Reakční směs byla ponechána k inkubaci přes noc v 4 °C nebo 2 hodiny za laboratorní teploty.

4.1.5 Transformace kompetentních bakterií *Escherichia coli*

Bakterie *Escherichia coli* (kmen DH5α) uchovávané v -80 °C byly pár minut ponechány na ledu do doby rozmražení. Následně bylo 50 µl bakterií převedeno do sterilní zkumavky a přidáno 1 µl DNA nebo 5 µl ligační směsi (viz kapitola 4.1.4). Směs bakterií a DNA byla ponechána 30 minut na ledu a poté byl proveden teplotní šok. Zkumavka byla umístěna na 1 minutu do lázně o teplotě 42 °C a hned poté na 2 minuty do ledu. Dále bylo přidáno 450 µl média Y2T a za stálého třepání ponecháno 1 hodinu ke kultivaci v 37 °C. 250 µl směsi bylo poté nanášeno na agarovou plotnu (100 g/ml ampicilinu). Agarové plotny byly inkubovány přes noc při 37 °C v 5% CO_2 .

4.1.6 Izolace a purifikace DNA

Bakterie byly inokulovány z agarové plotny do 2 ml média LB (100 g/ml ampicilinu) pomocí špičky. Směs v třepačce byla přes noc kultivována při 37 °C. Na druhý den byla převedena narostlá kolonie do 1,5ml zkumavek. Pomocí centrifugy bylo stočeno 7 minut (18600 x g) a poté byl odsán supernatant. Pro izolaci DNA byly použity roztoky „Quiagen Plasmid Midi Kit“. Peleta byla resuspendována v 200 µl vychlazeného roztoku P1. Následně bylo přidáno 200 µl roztoku P2 a bylo ponecháno 2 minuty k inkubaci. Nakonec bylo přidáno 200 µl roztoku P3 a opět 2 minuty ponecháno

k precipitaci za laboratorní teploty. Znovu centrifugováno 10 minut a 450 µl supernatantu bylo převedeno do nové zkumavky. K supernatantu bylo přidáno 900 µl absolutního ethanolu, který byl skladován v -20 °C a směs byla promíchána. Směs byla uložena přibližně na 1 hodinu do -20 °C. Následnou 10minutovou centrifugací (18600 x g) byl získán supernatant. Supernatant byl odsán a k peletě bylo přidáno 100 µl 70%obj ethanolu a 5 minut centrifugováno (18600 x g). Po odsátí ethanolu nad sedimentem bylo 15-20 minut sušeno, dokud veškerý zbytkový ethanol nebyl odpařen. K precipitátu bylo přidáno 30 µl PCR_{H2O}. Správnost izolace byla ověřována restričním štěpením a následnou agarózovou elektroforézou.

Pro purifikaci DNA po restričním štěpení byla použita komerční sada „QIAquick Gel Extraction Kit“. DNA byla vyříznuta z agarózového gelu a po zvážení bylo postupováno podle oficiálního protokolu firmy QIAquick pro přečištění DNA. Čistota a koncentrace DNA byla kontrolována pomocí agarózové elektroforézy a přístroje Nanodrop.

4.2 Sekvenování DNA

Sekvenování DNA bylo prováděno Sangerovou metodou firmou GATC Biotech (Německo). Směs pro sekvenaci byla připravena v celkovém objemu 10 µl. Obsahovala 1 µl DNA a 2,5 µl (25 pmol) příslušného sekvenačního primeru. Do zbytku objemu byla doplněna PCR_{H2O}. Oligonukleotidy byly syntetizovány firmou Sigma-Aldrich (USA). Seznam použitých oligonukleotidů včetně jejich sekvencí je uveden v Tab. 5.

Tab. 5 Oligonukleotidy použité pro sekvenaci

Název oligonukleotidu	Sekvence
Snap FW	GAAATCCCGTGCCCATCTG
bGH Poly RV	GAGGGGCAAACAACAGATGG
M13 FW	GTAAAACGACGGCCAG
M13 RV	CAGGAAACAGCTATGAC

4.3 Pasáž buněk

Z kultivační misky o průměru 15 cm s buňkami se zhruba 80-90% pokryvností bylo odsáno médium. Buňky byly následně 1x promyty PBS a bylo použito 5 ml 0,25% roztoku trypsinu v PBS po dobu 3 minut. Po uvolnění buněk od misky do suspenze bylo

k trypsinu přidáno 7 ml vytemperovaného média DMEM s 10% FBS. Buňky byly resuspendovány pipetou a pro následné použití byly přibližně spočítány pomocí přístroje EVE na automatické počítání buněk. Buňky byly pasážovány minimálně 2x do týdne v ředění 1:5 a využívány do maximální pasáže č. 30. Udržovány byly v inkubátoru s atmosférou 5% CO₂ a za teploty 37 °C.

4.4 Transfekce a stimulace buněk

Buňky byly dočasně transfekovány v 96-jamkových destičkách, jejichž dno bylo předem pokryto 0,001% poly-L-ornithinem připraveným v PBS. Destička byla inkubována 30 minut v 37 °C. Transfekce byla prováděna Lipofectaminem® 2000 podle instrukcí dodavatele. Ve zkratce, pro transfekci jedné jamky v 96-jamkové destičce bylo použito 200 ng DNA a 25 µl média Opti-MEM (1X). Odděleně bylo připraveno 0,5 µl Lipofectaminu 2000 s 25 µl Opti-MEM (1X). Po smíchání směsí bylo inkubováno 20 minut za laboratorní teploty. Následně bylo 50 µl směsi Lipofectaminu 2000 a DNA přidáno k čerstvě pasážovaným buňkám HEK293 (přibližně 50 000 buněk/100 µl) v každé jamce. Buňky byly pěstovány v médiu DMEM s 10% fetálním hovězím sérem (FBS). Minimálně po 4 hodinách inkubace v 5% CO₂ a za teploty 37 °C byla provedena výměna média za DMEM bez 10% FBS a inkubováno přes noc v 37 °C v 5% CO₂.

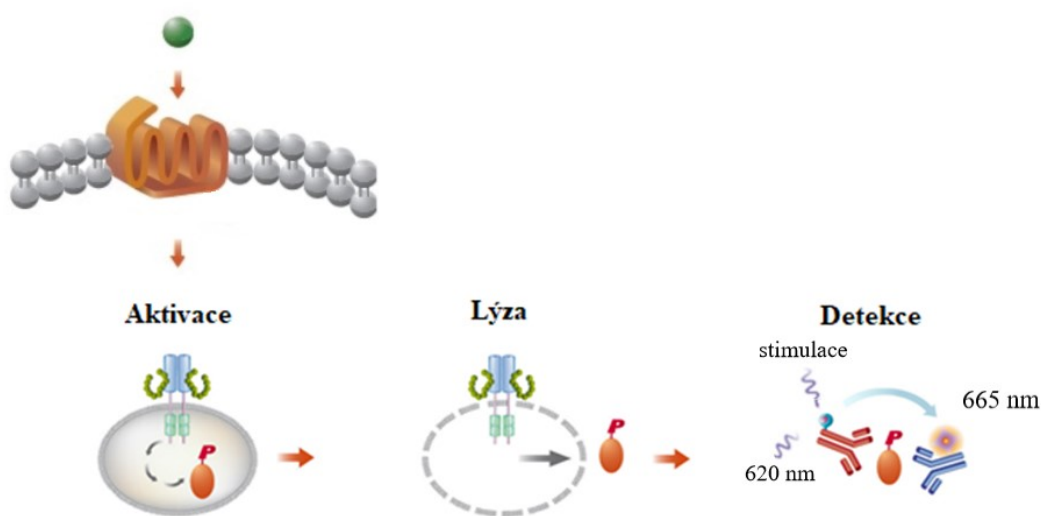
Buňky byly transfekovány připravenými expresními vektory spolu s Flag-SGIP1 (dále jen SGIP1) nebo s prázdným vektorem pRK5. Druhý den byly buňky stimulovány 1 µM neselektivním plným agonistou WIN, či 1 µM selektivním plným agonistou DAMGO po dobu dvaceti minut a hned poté lyzovány. Míra fosforylace byla stanovena prostřednictvím kompetitivní imunodetekce fosfo-ERK1/2.

4.5 Fosfo-ERK1/2

Fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) detekuje fosforylované formy ERK1/2. Skládá se ze tří kroků: aktivace, buněčná lýza a detekce signálu prostřednictvím HTRF (z angl. „Homogeneous Time resolved fluorescence“). Tato metoda „sendvičové“ imunoanalýzy zahrnuje inkubaci buněčného lyzátu s protilátkami, přičemž po stimulaci GPCR je ERK1/2 fosforylován a po lýzi buněčné membrány může být detekován za použití komerční sady Advanced phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (CisBio, Francie). Fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) funguje na bázi dvou různých specifických protilátek, z nichž jedna je označena kryptátem Eu³⁺ (donor) a druhá d2 (akceptor). První

protilátka má specifickou vazbu k fosforylované oblasti na proteinu, druhá má schopnost rozpoznat protein nezávisle na jeho fosforylovaném stavu. Když jsou protilátky v těsné blízkosti, excitace donoru světelným zdrojem spustí přenos FRET (z angl. „Fluorescence Resonance Energy Transfer“) směrem k akceptoru, který fluoreskuje při specifické vlnové délce (665 nm) (Obr. 9). Testovací destičky o 384 jamkách, byly měřeny na přístroji Mithras LB 940 (Berthold Technologies, Německo) a výsledné hodnoty byly získány jako poměr naměřené fluorescence v každé jednotlivé jamce (1).

$$\text{Poměr signálů} = \frac{665 \text{ nm}}{620 \text{ nm}} \cdot 10^4 \quad (1)$$



Obr. 9 Schéma provedení imunodetekce fosfo-ERK1/2. Po aktivaci GPCR prostřednictvím stimulace agonistou dochází k aktivaci a fosforylaci ERK1/2. Po lýze buněk jsou přidány detekční protilátky, které při stimulaci světelným zdrojem emitují světlo konkrétní vlnové délky. Výsledky jsou poté získány jako poměr těchto vlnových délek. (Převzato a upraveno podle protokolu CisBio assay)

4.6 Měření internalizace receptorů

Pro sledování internalizace receptorů byla použita technika HTRF, která je založena na časově rozlišeném měření fluorescence a přenosu fluorescenční rezonanční energie mezi donorovými a akceptorovými molekulami, jak už bylo zmíněno výše. Mezi molekulami donoru a akceptoru musí existovat spektrální překrytí, dostatečná vzdálenost a musí vykazovat vhodnou orientaci dipólu pro generování signálu FRET.

V naší práci byla tato metoda aplikována pro sledování vlivu SGIP1 na internalizaci receptorů z buněčného povrchu. Byly použity receptory označené značkou SNAP a barva fluorescein, která neprostupuje přes plazmatickou membránu. Po excitaci europium kryptátu (340 nm) byl měřen emisní signál donoru při 520 nm

a emisní signál FRET při 620 nm. Míra internalizace receptoru je prezentována jako poměr emisního signálu donoru vůči FRET signálu (620 nm/520 nm).

Výsledky internalizací receptorů byly získány před zahájením této práce ve spolupráci s oddělením Dynamiky a funkce neuroreceptorů, vedeným Laurantem Prezeauem, na Institutu funkční genomiky (Institut de Génomique Fonctionnelle) v Montpellier. Měření a postup byl proveden dle pokynů výrobce CisBio a do této práce nebude zahrnut.

4.7 Statistické vyhodnocení dat

Graficky zobrazená data v této práci představují průměrnou hodnotu \pm SEM ze dvou nebo tří nezávislých experimentů měřených v triplicátech. Statistické vyhodnocení bylo ve všech případech uvedeno jen pro pátou minutu pozorování. U mnoha měření není tato statistika dostatečně konzistentní vzhledem k nedostatečnému počtu nezávislých experimentů, a proto je rozšíření dat nezbytné pro průkaznější statistické vyhodnocení. Dosavadní výsledky byly vyhodnoceny pomocí softwaru GraphPad Prism s použitím dvoufaktorové analýzy rozptylu (Two-way ANOVA) a Bonferroniho post-hoc testu.

4.8 Příprava vzorků pro fluorescenční mikroskopii

Na destičku s 12 jamkami byla použita sklíčka o průměru 18 mm. Ta byla nejprve ponechána v 96% ethanolu a následně sterilizována opálením nad kahanem. Sterilizovaná sklíčka byla vložena do jamek a do každé jamky bylo přidáno 600 μ l poly-L-lysinu (5 mg/50 ml). Sklíčka se inkubovala s poly-L-lysinem 30 minut v 37 °C. Poté byla třikrát opláchnuta tkH₂O. Do každé jamky bylo pipetováno 1 ml média DMEM s 10% FBS a množství buněk odpovídající přibližně $0,2 \cdot 10^6$ buněk na jamku. Destičky s buňkami byly inkubovány přes noc při 37 °C s 5% CO₂. Druhý den byla provedena vápníko-fosfátová transfekce buněk podle protokolu od dodavatele (CalPhosTM Mammalian Transfection Kit user Manual). Přes noc bylo ponecháno v 37 °C s 5% CO₂.

Další den bylo z jamek s buňkami odsáto médium a jedenkrát opláchnut 500 μ l PBS. Následně bylo po odsátí PBS do jamek pipetováno 0,5 ml 4% paraformaldehydu pro fixaci buněk. Destička byla inkubována 15 minut. Fixační roztok paraformaldehydu byl odsán a sklíčka s buňkami byly 2x promyta roztokem PBS. Do každé jamky byla přidána SNAP-surface 647 barva (0,3 μ M) a 1 hodinu inkubována v temném prostředí

při laboratorní teplotě. Poté bylo čtyřikrát opláchnuto PBS a 10 minut permeabilizováno 500 μ l 0,05% roztokem Tritonu X-100. Po trojitém opláchnutí byla přidána SNAP-surface 549 barva (0,3 μ M) a inkubována 1 hodinu na temném místě za laboratorní teploty. Nakonec byly sklíčka v jamkách opláchnuty několikrát PBS a jednou tkH₂O. Sklíčka byla vyndána z jamek a ponechána k uschnutí. Na podložní sklíčko bylo naneseo malé množství Fluoroshield s barvou DAPI (fluorescenční barvivo 4',6-diamidin-2-fenylindol) a na tuto kapku bylo položeno sklíčko s buňkami. Preparáty byly ponechány k uschnutí do druhého dne.

4.9 Snímání obrázků fluorescenčním mikroskopem

S odbornou pomocí mého kolegy Oleha Durydivky, M.Sc. byly konfokálním mikroskopem Leica TCS SP5 AOBS Tandem (63x/1,40 OIL) snímány obrázky připravených preparátů. Na sklíčko byl nanesen imerzní olej typu F s refraktivním indexem 1,518. Různými lasery pro zobrazení požadovaných vlastností bylo snímáno několik vlnových délek (viz Tab. 6).

Tab. 6 Druhy vlnových délek a laserů pro zobrazení různých částí buňky

Snímaná část	Vlnová délka [nm]	Typ laseru
<i>Internalizovaná část</i>	561	DPSS
<i>Povrch</i>	633	He-Ne
<i>Jádra</i>	405	Fialový diodový
<i>SGIP1</i>	488	Argonový iontový

5 Výsledky I

5.1 Vytvoření nových chimérních receptorů

Pro mapování interakčních míst mezi CB1R a proteinem SGIP1 jsme vytvořili sérii chimérních receptorů mezi CB1R a MOR. Mezi CB1R a MOR jsme zaměnili dvě nitrobuněčné sekvence. Nejprve jsme prohodili karboxylové konce, tedy sekvence následující po 8. nitrobuněčném alfa-helixu. Protože chimérní receptory se zaměněnými C-konci měly pouze částečně pozměněný fenotyp, jako další oblast určenou pro záměnu jsme zvolili třetí intracelulární smyčky (3I).

Konstrukty chimérních receptorů CB1R a MOR byly připraveny DNA rekombinantní technologií (Obr. 10). Třetí intracelulární smyčka MOR o velikosti 512 bp byla vyštěpena z plazmidu se syntetickou DNA pomocí enzymů EcoNI a BspEI (Obr. 11B) a vložena do stejného enzymy štěpeného plazmidu s DNA kódující CB1R, popř. CB1R s vyměněným intracelulárním C-koncem. Třetí intracelulární smyčka CB1R o velikosti 401 bp byla vyštěpena z plazmidu s požadovanou syntetizovanou sekvencí (Obr. 11B) s použitím enzymů BsrGI a NsiI, vložena pomocí stejných restrikčních míst do plazmidu MOR, popř. již dříve vytvořeného konstrukt MOR s vyměněným intracelulárním C-koncem s CB1R. Pro přehlednost Tab. 7 shrnuje všechny potřebné vektory pro konstrukci nových chimérních konstruktů a enzymů použitých pro jejich štěpení.

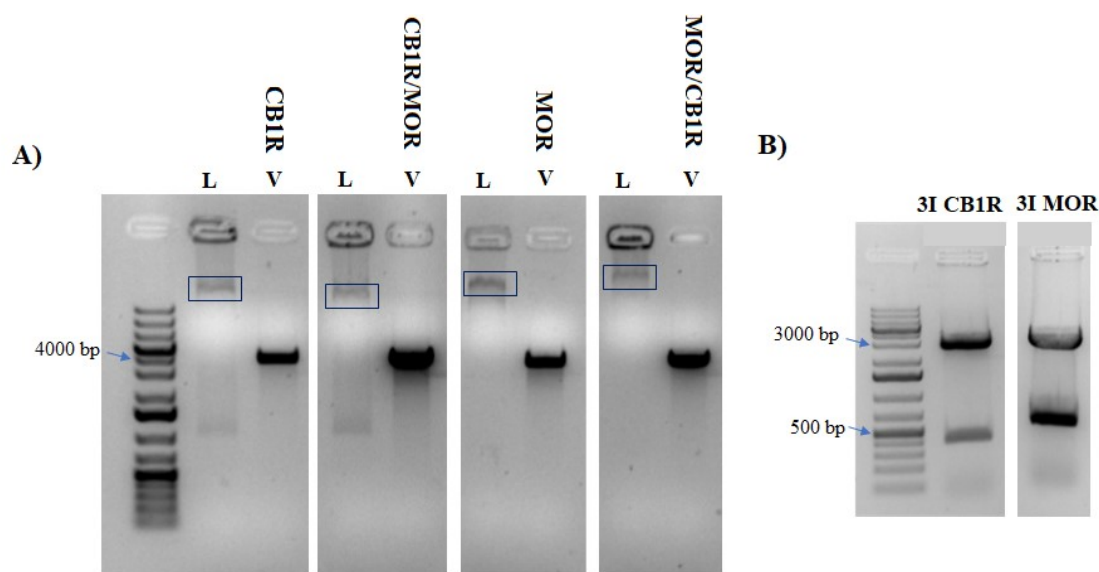
CB1R	MYILWKAHSHA VRMIQRGTQKSI IIHT SE DGKVQVTRPDQARMDIRLAKT
	... : :....: ...: :...
MOR	M I LRLK---SVRMLSGSKEK-----DRNLR-----RITRM
CB1R/MOR (3I)	MYILWKAHSHA V LRLKSVRMLSGSKEK-----DRNLR-----RLAKT
	:....: ...: :...
MOR/CB1R (3I)	M----- VRMIQRGTQKSI IIHT SE DGKVQVTRPDQARMDIRITRM

Obr. 10 Porovnání částí proteinových sekvencí receptorů s vyznačeními třetími intracelulárními smyčkami. Horní sekvence ukazují původní receptory. Druhé dvě sekvence ukazují porovnání proteinových sekvencí po záměně třetí intracelulární smyčky (3I) mezi receptory MOR a CB1R. V případě proteinové sekvence MOR je žlutě vyznačena první aminokyselina izoleucin (I), která byla zaměněna za aminokyselinu valin (V). Obě tyto aminokyseliny jsou nepolární a podobné strukturou. Celé nezaměněné proteinové sekvence receptorů jsou uvedeny v Příloze.

Tab. 7 Přehled vektorů použitých pro klonování intracelulárních smyček

Název vektoru*	Celková velikost vektoru (bp)	Použité enzymy pro štěpení	Velikost použitého fragmentu (bp)
<i>Smyčka MOR</i>	3428	EcoNI/BspEI	512
<i>Smyčka CB1R</i>	3310	BsrGI/NsiI	401
<i>CB1R</i>	4356	EcoNI/BspEI	3805
<i>CB1R/MOR</i>	4338	EcoNI/BspEI	3787
<i>MOR</i>	4137	BsrGI/NsiI	3775
<i>MOR/CB1R</i>	4153	BsrGI/NsiI	3793

*-V komerčních vektorech pBluescript



Obr. 11 Štěpení plazmidů a použité vektory a inserty pro ligaci, včetně kontrolní ligace.

A) Kontrolní ligace (L) před transformací do bakterií DH5a a vektory (V) použité pro ligaci. Zleva první dva plazmidy, CB1R a jeho chimérická verze s vyměněným C-koncem s MOR (CB1R/MOR), byly štěpeny enzymy EcoNI a BspEI. Pro ligaci byl použit insert třetí intracelulární smyčky MOR. Druhé dva plazmidy, MOR a jeho chimérická verze s vyměněným C-koncem s CB1R (MOR/CB1R), byly štěpeny BsrGI a NsiI. V tomto případě, naštěpené vektory byly ligovány s insertem třetí intracelulární smyčky CB1R. B) Štěpení konstruktů dodaných firmou GenCust pro získání insertů. Třetí intracelulární smyčka (3I) CB1R (401 bp) byla získána štěpením konstruktů o velikosti 3310 bp, restrikčními enzymy BsrGI a NsiI (Vlevo). Třetí intracelulární smyčka MOR (512 bp) byla získána štěpením konstruktů o velikosti 3428 bp pomocí restrikčních enzymů EcoNI a BspEI (Vpravo). Pro odhad velikosti fragmentů byl použit komerční standard GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder. Ukázané v 1% agarózovém gelu.

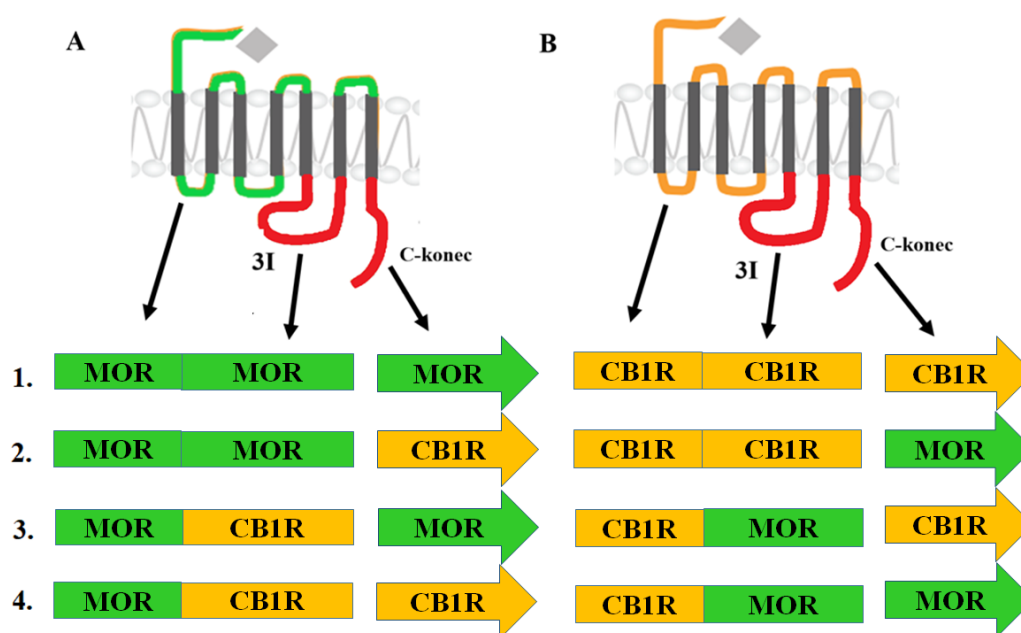
Prostřednictvím enzymů EcoRV a XhoI byly všechny požadované chimérické sekvence vloženy do expresního vektoru pRK5 nesoucího sekvenci SNAP (Tab. 8). Každý připravený konstrukt byl před použitím ověřen restrikčním štěpením a poté byla nově vzniklá DNA ověřena sekvenací.

Tab. 8 Přehled vektorů a enzymů použitých pro klonování do expresního vektoru pRK5 obsahující SNAP

Název vektoru*	Celková velikost vektoru (bp)	Použité enzymy pro štěpení	Velikost použitého fragmentu (bp)
CB1R	4194	EcoRV/XhoI	1261
CB1R/MOR	4317	EcoRV/XhoI	1384
MOR	4155	EcoRV/XhoI	1366
MOR/CB1R	4338	EcoRV/XhoI	1243
SNAP-CB1R	7460	EcoRV/XhoI	6037
SNAP-CB1R/MOR	7442	EcoRV/XhoI	6037
SNAP-MOR	7241	EcoRV/XhoI	6037
SNAP-MOR/CB1R	7259	EcoRV/XhoI	6037

*- V expresním vektoru pRK5

Pro snazší orientaci jsme zavedli jednotnou nomenklaturu nově vytvořených chimér. V názvu je nejdříve sekvence N-koncové a 7TM části receptoru. Následují sekvence označuje třetí intracelulární smyčku (3I) a C-konec receptoru, které jsme v některých konstruktech zaměnili (vyznačeno červeně). Názvy původních receptorů zůstaly nezměněné (Obr. 12).



Obr. 12 Zavedení nomenklatury používané v této práci.

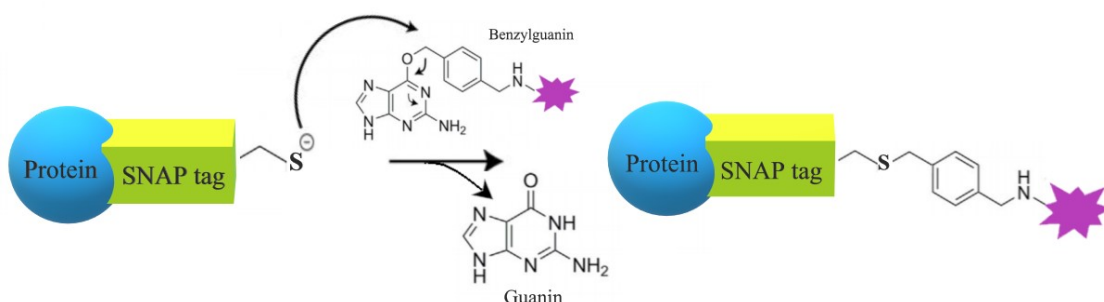
A) Mu-opioidní receptor. 1a) Pro přehlednost bude původní receptor označován MOR. 2a) MOR/MOR/CB1R 3a) MOR/CB1R/MOR 4a) MOR/CB1R/CB1R.

B) Kanabinoidní receptor 1. 1b) Pro přehlednost bude zkracován původní receptor CB1R. 2b) CB1R/CB1R/MOR 3b) CB1R/MOR/CB1R 4b) CB1R/MOR/MOR.

5.2 Ověření exprese nových chimérních receptorů

Abychom mohli nově vytvořené konstrukty používat, museli jsme nejprve ověřit, že receptory kódované těmito nově vytvořenými DNA jsou v buňkách správně exprimované, poskládané a jsou lokalizovány srovnatelně s jejich nemutovanými variantami. Exprese a lokalizace našich konstruktů v transfekovaných buňkách HEK293 byla hodnocena pomocí fluorescenční mikroskopie.

Všechny použité konstrukty mají zakódovanou sekvenci pro značku SNAP odvozenou od O⁶-guanin nukleotidu alkyltransferázy, která specificky reaguje s deriváty benzyl guaninu za vzniku kovalentní vazby (Obr. 13). Fluorescenční značka připojená na derivát benzylguaninu umožňuje detekci.

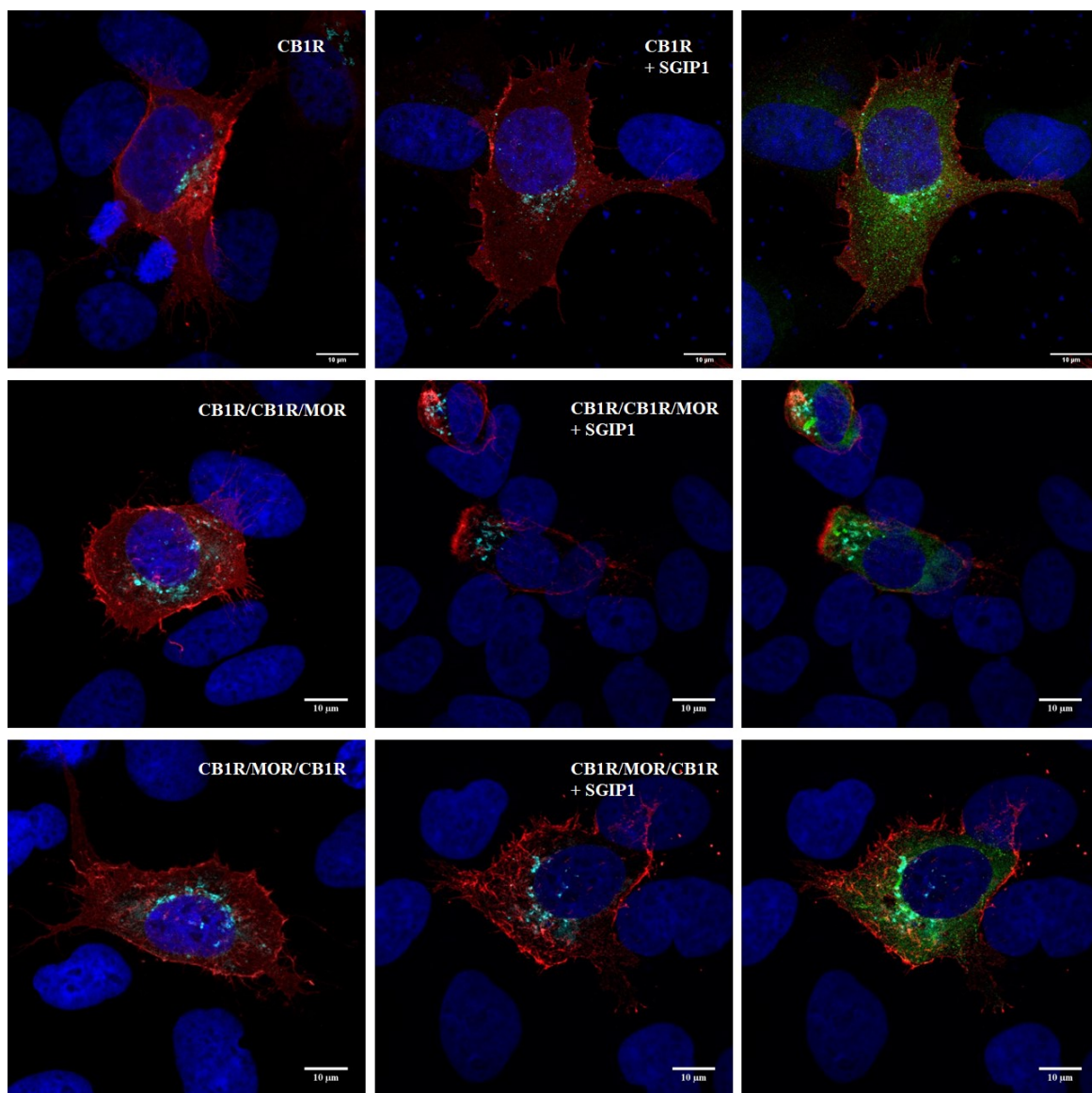


Obr. 13 Schematické znázornění vazby benzylguaninového substrátu na protein obsahující značku SNAP. Značka SNAP je spojena s proteinem, který nás zajímá. Po vazbě reaguje benzylová skupina s cysteinem v aktivním místě značky SNAP, přičemž uvolní guaninovou skupinu.

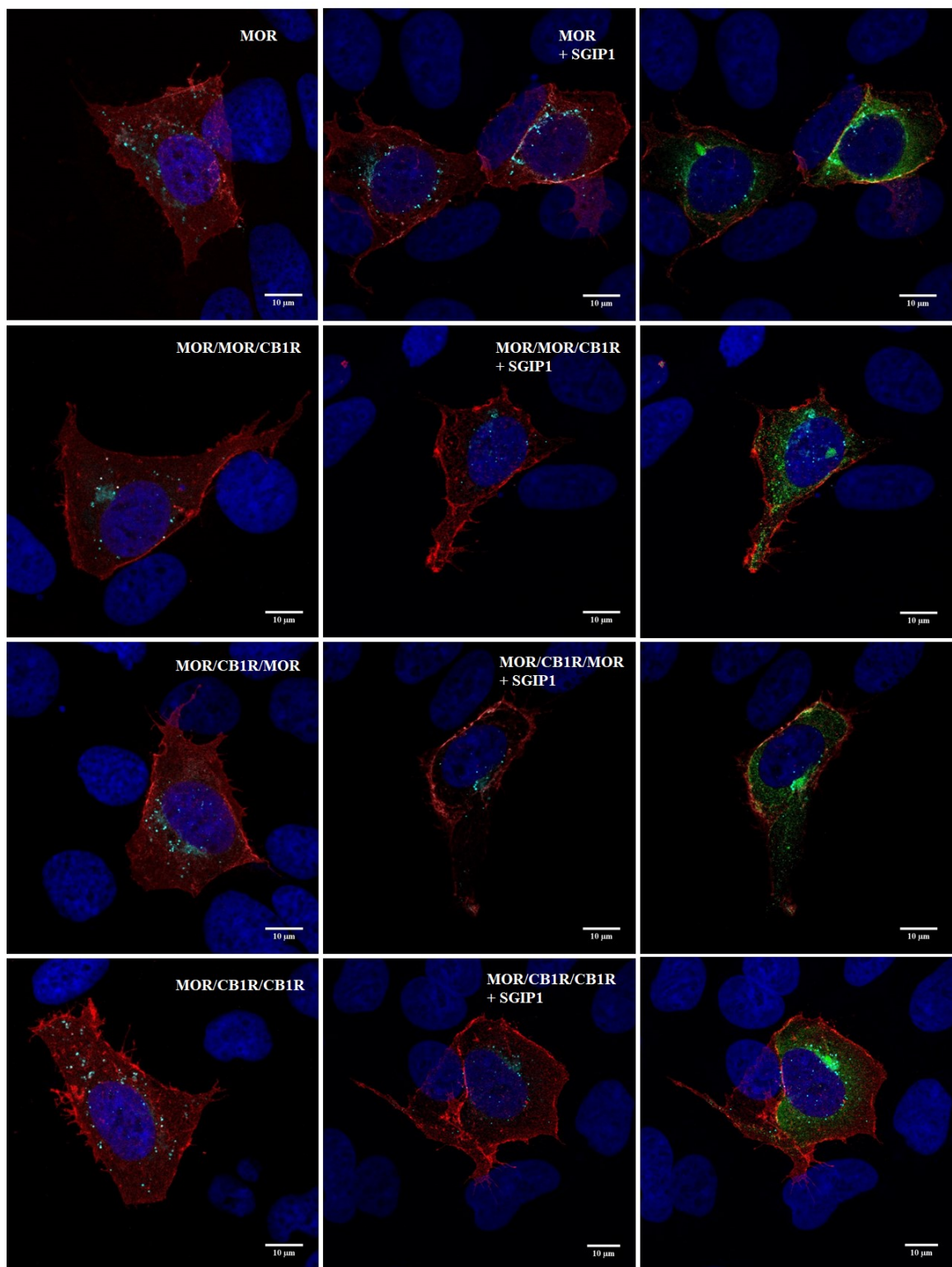
Pro zobrazení SGIP1 v buňkách HEK293 byl použit plazmid SGIP1 s fluorescenčním proteinem GFP (z angl. „Green fluorescent protein“), který emituje signál při osvětlení světlem o vlnové délce 488 nm. Vlnové délky ostatních fluoroforů použitých pro zobrazení povrchu a vezikul v buňce jsou ukázány v kapitole 4.9 (Tab. 6).

Buňky HEK293 byly transfekované chimérními receptory CB1R (Obr. 14) nebo MOR (Obr. 15) a to bez SGIP1, nebo zároveň s ním. Z výsledků fluorescenční mikroskopie můžeme odvodit, že receptor (červený kanál) je vázaný na membrány, SGIP1 (zelený kanál) je lokalizovaný převážně v cytoplazmě, či v blízkosti membrány anebo ve vezikulách uvnitř buněk (tyrkysový kanál). Pro orientaci byla jádra obarvena pomocí barvy DAPI (modrý kanál).

Výsledky z mikroskopického zobrazení potvrzují, že všechny chimérní receptory jsou exprimovány v transfekovaných buňkách HEK293 a asociovány s cytoplazmatickými membránami. Ko-transfekce receptoru s proteinem SGIP1 nijak výrazně neovlivnila expresi ani lokalizaci receptorů v buňkách HEK293.



Obr. 14 Ověření exprese a lokalizace CB1R a jeho chimérických verzí v buňkách HEK293 bez nebo v přítomnosti SGIP1. Modře značená jádra pomocí DAPI, červeně označený povrch barvou SNAP-surface 647, po permeabilizaci membrány byla internalizovaná část značena barvou SNAP-surface 549 (tyrkysová). První sloupec vlevo zachycuje buňky bez SGIP1. Druhý sloupec zleva ukazuje konstrukty v buňkách HEK293 ko-transfekované s SGIP1, který není zobrazen. Třetí sloupec ukazuje celkový překryv receptoru a SGIP1.



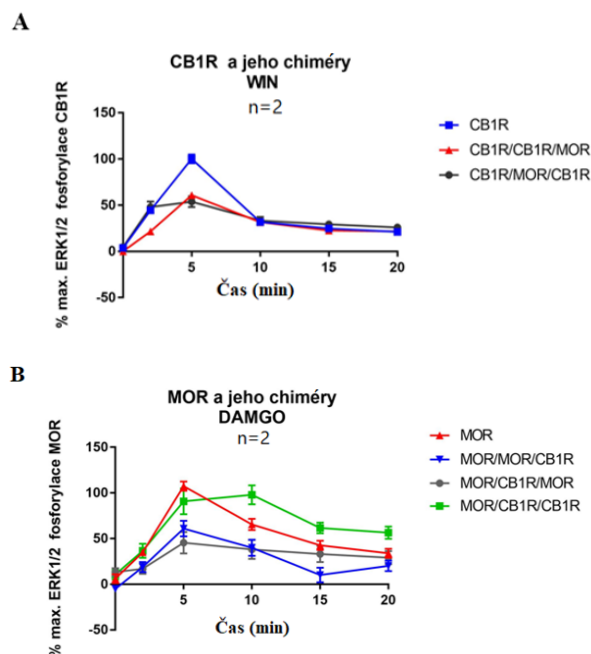
Obr. 15 Ověření exprese a lokalizace MOR a jeho chimérických verzí v buňkách HEK293 bez nebo v přítomnosti SGIP1. Modře značená jádra pomocí DAPI, červeně označený povrch barvou SNAP-surface 647, po permeabilizaci membrány byla internalizovaná část značena barvou SNAP-surface 549 (tyrkysová). První sloupec vlevo zachycuje buňky bez SGIP1. Druhý sloupec zleva ukazuje konstrukty v buňkách HEK293 ko-transfekované s SGIP1, který není zobrazen. Třetí sloupec ukazuje celkový překryv receptoru a SGIP1.

5.3 Ověření funkčnosti nových chimérních receptorů

Důležitou kontrolou je ověření aktivace receptoru a ovlivnění nitrobuňkové signalizace. U nově vytvořených receptorů jsme zjišťovali aktivaci ERK1/2 po stimulaci příslušným agonistou. Pro stimulaci CB1R v buňkách HEK293 byl použit 1 μ M WIN a pro MOR 1 μ M agonista DAMGO (Obr. 16).

U chimér CB1R/CB1R/MOR a CB1R/MOR/CB1R jsme detekovali srovnatelnou odpověď po stimulaci WIN, která je však přibližně poloviční oproti nijak nezměněnému receptoru CB1 (Obr. 16A). Zatímco u MOR/MOR/CB1R je aktivace této dráhy srovnatelná s původním MOR, u některých chimérních verzí MOR dochází k odlišnému kinetickému průběhu aktivace ERK1/2. U chimérní verze MOR/CB1R/MOR má fosforylace ERK1/2 rychlý nárůst v pěti minutách, a poté míra fosforylace zůstává skoro nezměněna až do dvacáté minuty (Obr. 16C). U chiméry MOR/CB1R/CB1R pozorujeme vysoký nárůst fosforylace ERK1/2 mezi 5-10 minutou, která je srovnatelná v 5 minutě s nezměněným MOR (Obr. 16B).

Naše výsledky dokazují, že všechny použité konstrukty jsou aktivované příslušným agonistou, který se váže v 7TM oblasti a vazba tohoto agonisty způsobuje aktivaci receptorů, jež je prokázána sledováním aktivace nitrobuňkové signalizace ERK1/2. Některé chiméry ale vykazují pozměněnou kinetiku signalizace ERK1/2.



Obr. 16 Kinetika fosforylace ERK1/2 pro chiméry CB1R a MOR po stimulaci agonisty v buňkách HEK293. Buňky HEK293 byly transfekovány chimérními receptory nebo CB1R a MOR. Transfekované buňky byly stimulovány agonistou 20 minut, následně lyzovány a byl získán poměr fluorescencí (665 nm/620 nm). A) CB1R a jeho chiméry byly stimulovány 1 μ M WIN. B) MOR a jeho chiméry byly stimulovány 1 μ M DAMGO. Data představují průměrnou hodnotu \pm SEM ze dvou nezávislých experimentů (n=2) měřených v triplicátech.

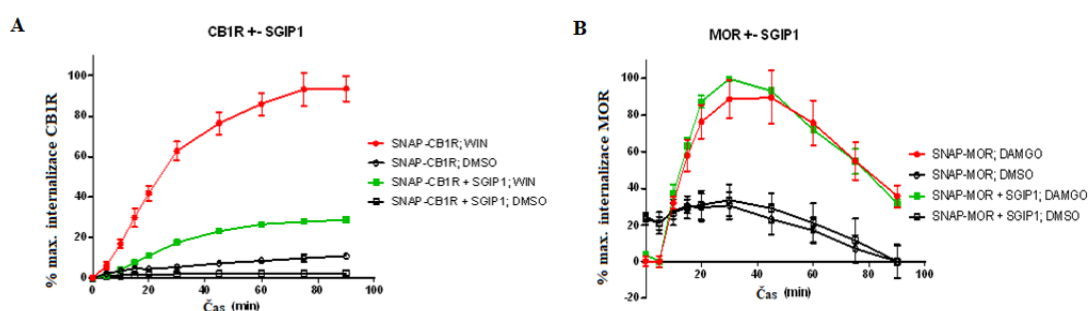
6 Výsledky II

6.1 Internalizace a ovlivnění signalizace CB1R proteinem SGIP1

6.1.1 Internalizace receptorů CB1R a MOR

Internalizace je důležitá nejen pro ukončení GPCR signalizace při dlouhodobém působení podnětu a snížení počtu dostupných receptorů na buněčném povrchu (downregulace), ale také pro receptorovou resenzitizaci. Proto byla sledována internalizace v buňkách transfekovaných CB1R a MOR v přítomnosti a nepřítomnosti SGIP1 pomocí metody HTRF (Obr. 17). Grafy na obrázku ukazují množství internalizovaných receptorů do buňky z buněčného povrchu. Tyto doposud nepublikované výsledky byly získány před začátkem naší práce a jsou to klíčové poznatky pro další naše kroky.

Naměřené internalizace receptoru ukazují, že SGIP1 neovlivňuje internalizaci MOR po stimulaci 5 μ M DAMGO. Naopak u receptoru CB1R jsme jak tímto, tak již dříve prokázali, že SGIP1 významně snižuje internalizaci aktivovaného CB1R⁴.

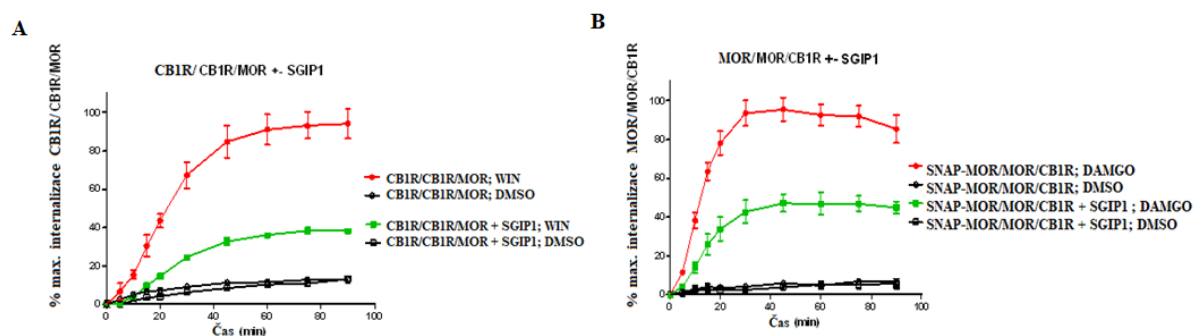


Obr. 17 Internalizace CB1R a MOR ovlivněná přítomností SGIP1. Stimulace receptorů s 1 μ M WIN pro CB1R a 5 μ M DAMGO pro MOR. A) SGIP1 ovlivňuje internalizaci CB1R, B) v případě MOR nemá SGIP1 vliv na průběh internalizace. (Nepublikovaná data, Mgr. M. Gazdarica)

6.1.2 Internalizace chimérních receptorů CB1R a MOR

Pozorování, že SGIP1 blokuje internalizaci CB1R, ale ne MOR, nás vedlo k vytvoření chimérních verzí CB1R a MOR s vyměněným C-koncem (Obr. 18). Při porovnání internalizace MOR (Obr. 17) a jeho chimérní verze MOR/MOR/CB1R v přítomnosti SGIP1 jsme zjistili, že došlo k částečnému působení SGIP1 na internalizaci ve srovnání s MOR. Internalizace chiméry CB1/CB1/MOR, byla v přítomnosti SGIP1 také ovlivněna, avšak ne ve srovnatelné míře, jak tomu je u původního CB1R. Z těchto dat jsme vyvodili, že C-konec CB1R se aktivně podílí na funkční interakci

s proteinem SGIP1, avšak že pravděpodobně existuje i další doména v CB1R, která se podílí na této protein-proteinové interakci. Touto další interakční doménou by mohla být třetí intracelulární smyčka. Provedení internalizačních testů pro všechny nově vytvořené chiméry bude následovat v další fázi projektu, nejsou však zahrnuty v této práci.



Obr. 18 Internalizace chimérního receptorů CB1R/CB1R/MOR a MOR/MOR/CB1R ovlivněné přítomností SGIP1. Stimulace 1 μ M WIN pro CB1R a 5 μ M DAMGO pro MOR. A) U chimérního receptoru CB1R/CB1R/MOR dochází k ovlivnění internalizace pomocí SGIP1. B) Chimérní verze MOR/MOR/CB1R je částečně ovlivněna prostřednictvím SGIP1. (Nepublikovaná data, Mgr. M. Gazdarica)

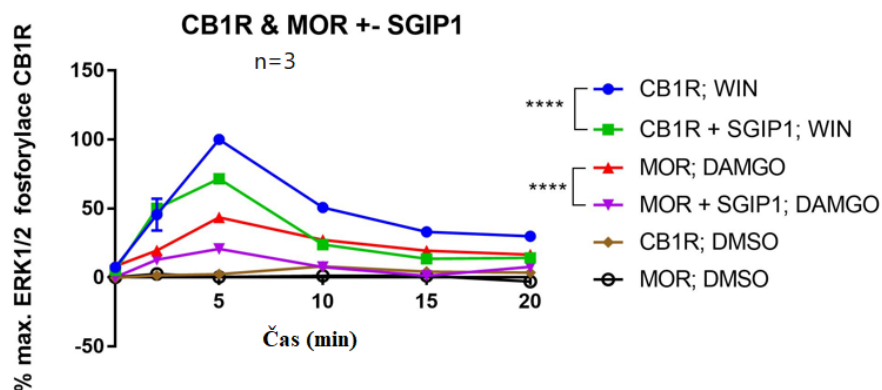
6.2 Měření aktivity ERK1/2

6.2.1 Ovlivnění ERK1/2 signalizace CB1R, MOR proteinem SGIP1

SGIP1 tedy ovlivňuje internalizaci a signalizační charakteristiku CB1R, mimo jiné snižuje i aktivaci ERK1/2. Proto nás zajímalo, zdali bude ovlivněna tato signalizace i u receptoru MOR, jehož internalizace není proteinem SGIP1 ovlivněna.

Signalizační dráha ERK1/2 byla sledována v přítomnosti SGIP1 po stimulaci receptorů. Byla měřena za situace bez SGIP1 a srovnána s průběhem v přítomnosti SGIP1 po stimulaci receptorů příslušným agonistou, 1 μ M agonistou WIN u CB1R a od něj odvozených chimérních receptorů, či 1 μ M selektivním plným agonistou DAMGO u MOR a jeho chimér.

Kinetika fosforylace ERK1/2 po dobu 20 minut je v případě CB1R a MOR srovnatelná. K největšímu nárůstu fosforylace dochází v 5 minutách po stimulaci agonistou a poté se míra fosforylace ERK1/2 vrací na bazální úroveň (Obr. 19). Ačkoliv časový průběh je podobný, v přítomnosti SGIP1 je maximální odpověď fosforylace ERK1/2 nižší jak u CB1R, tak u MOR. Rozdíl mezi aktivací ERK1/2 receptory CB1R a MOR v pěti minutách po stimulaci je signifikantní.



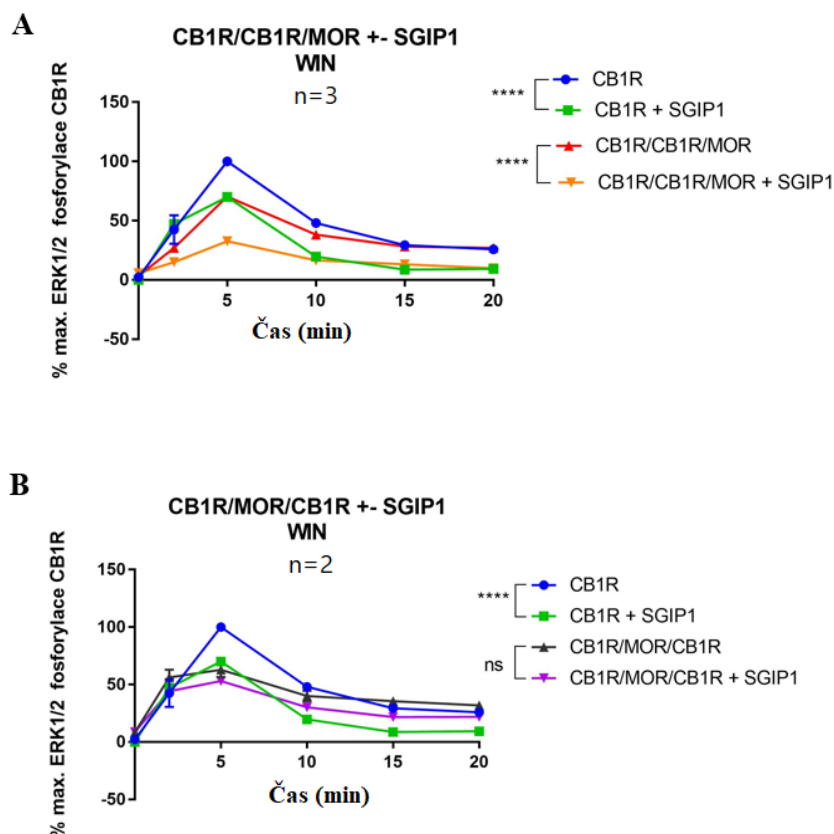
Obr. 19 Kinetika fosforylace ERK1/2 pro MOR a CB1R v přítomnosti i bez SGIP1 po stimulaci agonisty v buňkách HEK293. Buňky HEK293 byly transfekovány samostatně CB1R, MOR nebo ko-transfekovány s Flag-SGIP1. Transfekované buňky byly stimulovány agonistou 20 minut, následně lyzovány a byl získán poměr fluorescence (665 nm/620 nm). V případě CB1R s/bez SGIP1 byl stimulován 1 μ M WIN. MOR s/bez SGIP1 byl stimulován 1 μ M DAMGO. Data představují průměrnou hodnotu \pm SEM ze tří nezávislých experimentů ($n=3$) měřených v triplicátech. Statisticky významné rozdíly byly stanoveny dvoufaktorovou analýzou rozptylu (Two-way ANOVA) v páté minutě pozorování. **** $p < 0,0001$

6.2.2 Ovlivnění ERK1/2 signalizace chimérních variant CB1R proteinem SGIP1

Po dobu dvaceti minut jsme sledovali ovlivnění fosforylace ERK1/2 proteinem SGIP1 také u nově vytvořených chimérních receptorů CB1R (Obr. 21). U původních CB1R a MOR dochází k nárůstu fosforylace ERK1/2 okolo 5 minut po stimulaci. Po dosažení maximální míry fosforylace ERK1/2 dochází k návratu na bazální úroveň. Podobný průběh mají i některé nově vytvořené chiméry. Zaznamenali jsme signifikantní rozdíl aktivace signalizační dráhy ERK1/2 v páté minutě u CB1R/CB1R/MOR v porovnání s CB1R/CB1R/MOR + SGIP1.

U chiméry CB1R/MOR/CB1R, která má zaměněnou třetí intracelulární smyčku s MOR, SGIP1 neměl skoro žádný vliv na míru fosforylace ERK1/2. Tato chiméra také stimulovala ERK1/2 signalizaci s rozdílnou kinetikou než původní CB1R.

Vzhledem k značným problémům při klonování chimérního expresního vektoru CB1R/MOR/MOR, bylo toto klonování dokončeno, ale jeho ověření fluorescenční mikroskopií a signalizační dráha ERK1/2 nebyla doposud změřena.



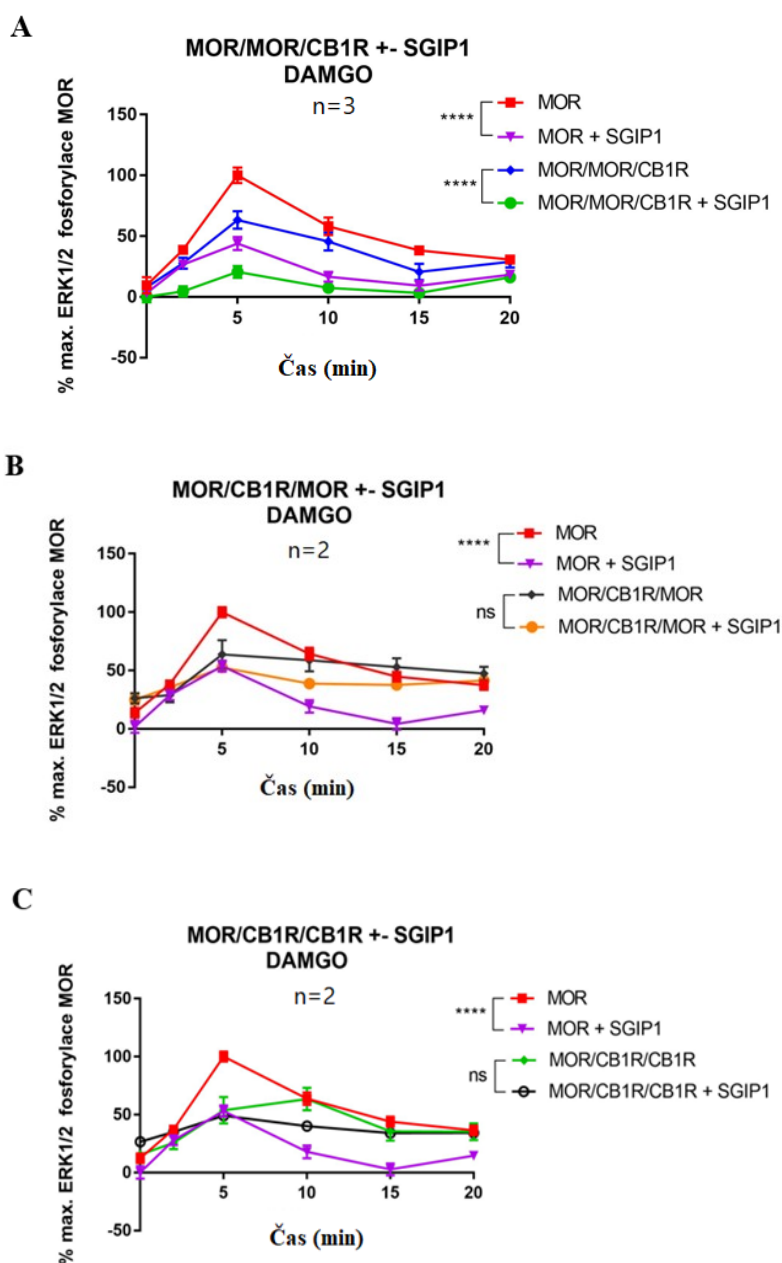
Obr. 20 Kinetický průběh fosforylace ERK1/2 po stimulaci 1 μ M WIN pro chimérní receptory CB1R v porovnání s původním CB1R v buňkách HEK293. A) Kinetický průběh chimérního receptoru CB1R/CB1R/MOR bez a v přítomnosti Flag-SGIP1. B) Kinetický průběh chiméry CB1R/MOR/CB1R bez a s Flag-SGIP1. Data představují průměrnou hodnotu \pm SEM ze dvou ($n=2$) nebo tří ($n=3$) nezávislých experimentů měřených v triplicátech. Statisticky významné rozdíly byly stanoveny dvoufaktorovou analýzou rozptylu (Two-way ANOVA) v páté minutě pozorování. **** $p < 0.0001$; ns (nesignifikantní) $p > 0.1234$

6.2.3 Ovlivnění ERK1/2 signalizace chimérních variant MOR proteinem SGIP1

V případě aktivace chiméry MOR/MOR/CB1R dosahuje ERK1/2 fosforylačního maxima v 5 minutách po stimulaci 1 μ M agonistou DAMGO a následně se pomalu vrací na bazální hladinu, podobně jako MOR (Obr. 21A). U obou receptorů je zřetelný vliv proteinu SGIP1 na fosforylaci ERK1/2.

U receptoru s vyměněnou třetí intracelulární smyčkou, tedy MOR/CB1R/MOR, dochází mezi 5-20 minutou téměř ke konstantní odpovědi míry fosforylace EKR1/2 (Obr. 21B). V přítomnosti SGIP1 u této chiméry pozorujeme zanedbatelný vliv jak na míru fosforylace ERK1/2, tak na kinetický průběh reakce. Chimérní receptor MOR/CB1R/CB1R, dosahuje maxima stimulace ERK1/2 okolo 10 minut. V tomto případě můžeme sledovat v 10 minutě po stimulaci agonistou signifikantní rozdíl (* $p \leq 0.05$) mezi receptorem bez a v přítomnosti SGIP1 (Obr. 21C).

Z výsledků je tedy patrné, že aktivace ERK1/2 chimérním receptorem MOR/CB1R/MOR není ovlivněna SGIP1 a MOR/CB1R/CB1R byl mírně ovlivněn SGIP1 až v 10 minutě po stimulaci. Naopak v případě MOR/MOR/CB1R, protein SGIP1 signifikantně ovlivňuje signalizaci ERK1/2 a jako jediný chimérní receptor vykazuje kinetické charakteristiky původních receptorů s maximem aktivace v páté minutě po stimulaci agonistou.



Obr. 21 Kinetický průběh fosforylace ERK1/2 po stimulaci 1 μ M DAMGO pro MOR chimérní receptory. A) Kinetický průběh chimérního receptoru MOR/MOR/CB1R bez a v přítomnosti Flag-SGIP1. B) Kinetický průběh chiméry MOR/CB1R/MOR bez a s Flag-SGIP1. C) Kinetický průběh chimérního receptoru MOR/CB1R/CB1R bez a v přítomnosti Flag-SGIP1. Data představují průměrnou hodnotu \pm SEM ze dvou (n=2) nebo tří (n=3) nezávislých experimentů měřených v triplicátech. Statisticky významné rozdíly byly stanoveny dvoufaktorem analýzou rozptylu (Two-way ANOVA) v páté minutě pozorování. **** $p < 0.0001$; ns (nesignifikantní) $p > 0.1234$

7 Diskuze

SGIP1 je u savců exprimován téměř výhradně v CNS a především v presynaptických částech axonů, kde jsou také lokalizované kanabinoidní receptory 1 (CB1R)³¹ a mu-opioidní receptory (MOR)². Oba receptory jsou cílem pro léky (buprenorfin, metadon, fentanyl a morfin u MOR a kanabidiol, dronabinol u CB1R), ale i drogy (heroin u MOR a THC u CB1R). Pro pochopení jejich funkcí je důležité studium mechanismů modulace jejich činností. CB1R i MOR vzájemně interagují funkčně a fyzicky *in vivo*. V této práci jsme se zabývali mechanismy ovlivnění jejich signalizace proteinem SGIP1. Zajímalo nás, zda je MOR ovlivňován proteinem SGIP1, tak jako je tomu v případě CB1R.

Internalizace CB1R je blokována přítomností SGIP1, zatímco internalizace MOR není proteinem SGIP1 pozměněna. Průběh internalizace těchto receptorů se mění v případě záměny jejich C-konce. U chimérního receptoru MOR/MOR/CB1R je internalizace proteinem SGIP1 ovlivněna. Internalizace chimérního receptoru CB1R/CB1R/MOR je ovlivněna proteinem SGIP1 méně než v případě CB1R.

Další záměna mezi MOR a CB1R byla provedena v rámci jejich třetích intracelulárních smyček. Tvorba chimérních receptorů byla realizována tak, aby byly zachovány sekvence důležité pro jejich funkci. Fluorescenční mikroskopií bylo ukázáno, že u nově vytvořených chimérních receptorů dochází k srovnatelné expresi a lokalizaci v buňkách, jako u původních receptorů.

Z měření aktivity ERK1/2 je zjevné, že všechny chimérní receptory jsou schopné aktivovat tuto signální dráhu, ač některé mají odlišnou kinetiku aktivace ERK1/2 než původní receptory. Jednalo se o konstrukty, v nichž je v MOR zaměněna třetí nitrobuněčná smyčka za sekvenci odpovídající CB1R.

V případě CB1R jsme se domnívali, že SGIP1 zabraňuje signalizaci ERK1/2 zprostředkované komplexem receptor- β -arrestin, který se tvoří během pozdních kroků internalizace. Očekávali jsme tedy, že u MOR signální dráha ERK1/2 nebude proteinem SGIP1 ovlivněna. Sledování aktivity ERK1/2 v přítomnosti SGIP1 však ukazuje pokles i v případě aktivace MOR. U chimérních receptorů CB1R vidíme ovlivnění fosforylace ERK1/2 v přítomnosti SGIP1 jen u chiméry v oblasti C-konce CB1R/CB1R/MOR. U chiméry CB1R/MOR/CB1R jsme zaznamenali stejný kinetický profil a hladina míry fosforylace není ovlivněna proteinem SGIP1.

Chiméra MOR/MOR/CB1R je ovlivněna přítomností SGIP1. V případě MOR/CB1R/MOR dochází k růstu míry fosforylace ERK1/2 v prvních 5 minutách, poté se ale hladina fosforylace udržuje konstantní. MOR/CB1R/CB1R dokonce vykazuje mnohem vyšší hladiny fosforylace než ostatní chiméry. Poslední dva chimérní receptory mají odlišnou kinetiku fosforylace ERK1/2 než ostatní receptory, proto bude nezbytné další data získaná s těmito chimérami hodnotit velmi obezřetně. Zajímavé je, že signalizace ERK1/2 nebyla u těchto dvou chimér ovlivněna proteinem SGIP1.

Pokud porovnáme proteinové sekvence třetích intracelulárních smyček MOR a CB1R (viz Příloha; modře), zjistíme, že v případě MOR je tato smyčka podstatně kratší, a to tedy poskytuje méně potenciálních míst pro fosforylaci intracelulárních částí receptoru. To samé můžeme říct o intracelulárním C-konci MOR (červeně). V porovnaných proteinových sekvencích je možné také vidět části sekvencí –NxLV, LAxAD, DRY, NSxxNPxxY a CWxP (vyznačené žlutě), což jsou konzervované motivy v těchto GPCR⁴⁰, důležité pro aktivaci těchto receptorů⁴¹. Jak již bylo zmíněno, signální dráha ERK1/2 je částečně zprostředkována vazbou β -arrestinů na fosforylované serinové (S) a threoninové (T) zbytky v intracelulárních částech receptoru. Při porovnání množství těchto aminokyselin v proteinové sekvenci MOR a CB1R (zvýrazněno šedou barvou), vidíme značnou odlišnost, jež je možná příčinou netypické aktivace ERK1/2 u některých chimérických receptorů.

Zajímavé pozorování vyplývající ze současných výsledků je, že přestože SGIP1 neovlivňuje internalizaci MOR, modulaci signální dráhy ERK1/2 jsme pozorovali. Hypoteticky, tím že SGIP1 v rámci APA domény váže a aktivuje AP-2 komplex, může iniciovat asociaci a shlukování i s dalšími molekulami, například β -arrestinem. Tak by mohl protein SGIP1 ovlivňovat signalizaci ERK1/2 poblíž plasmatické membrány. Tato hypotéza zasluhuje, dle našeho názoru, podrobné vysvětlení na molekulární úrovni a bude předmětem dalšího zkoumání.

8 Závěr

SGIP1 je modulátor internalizace a signalizace CB1R, ale neovlivňuje internalizaci MOR. Internalizace chimérních verzí obou receptorů s navzájem zaměněnými C-konci je částečně ovlivněna proteinem SGIP1. U CB1R s C-koncem z MOR SGIP1 částečně ztrácí efekt a internalizace MOR s C-koncem z CB1R je v přítomnosti SGIP1 modulovaná.

I přesto, že SGIP1 neovlivňuje internalizaci MOR, v přítomnosti SGIP1 dochází ke snížení aktivace ERK1/2 tímto receptorem. Protein SGIP1 také snižuje aktivaci ERK1/2 chimérou MOR s vyměněným C-koncem z receptoru CB1 i míru fosforylace ERK1/2 u chimérického receptoru CB1R s C-koncem z MOR.

V případě záměny třetí intracelulární smyčky u MOR za sekvenci z CB1R dochází k odlišnému průběhu aktivace ERK1/2 touto chimérou. Aktivace ERK1/2 v tomto případě po pěti minutách neklesá a zůstává konstantní až do konce měření. U chimérické verze CB1R s vyměněnou třetí intracelulární smyčkou z MOR je míra aktivace ERK1/2 nižší než u CB1R a trvá déle v porovnání s CB1R indukovanou fosforylací. SGIP1 u těchto chimér měl jen malý vliv na aktivaci ERK1/2.

Nejzajímavějším pozorováním této práce je fakt, že i u některých receptorů jako například u MOR, je aktivace ERK1/2 modifikována proteinem SGIP1, aniž by jejich internalizace byla tímto proteinem ovlivněna. Naše současná hypotéza je, že SGIP1 může mít vliv na celkovou úroveň signalizace ERK1/2 v buňce, zatímco ovlivnění internalizace CB1R receptorů je podmíněna specificky, přímou interakcí s proteinem SGIP1.

Absenci vlivu SGIP1 na ERK1/2 aktivaci chimérickými receptory se zaměněnými sekvencemi v oblasti třetí intracelulární smyčky plánujeme dále analyzovat, v současné době nejsou všechna měření k dispozici. Bude zajímavé porovnat míru fosforylace ERK1/2 všech chimér CB1R obsahujících vyměněné intracelulární části s MOR (třetí intracelulární smyčku i C-konec). V následujícím testování budeme také zjišťovat ovlivnění dalších signálních drah a jejich internalizace těmito receptory.

Poznatky získané v rámci tohoto projektu a částečně popsané v této práci objasňují vliv proteinu SGIP1 na signalizaci receptorů CB1R a MOR.

9 Seznam použité literatury

1. Rios, C., Gomes, I., and Devi, L.A. (2006). μ opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis. *Br J Pharmacol* 148, 387-395.
2. Sierra, S., Gomes, I., and Devi, L.A. (2017). Class A GPCRs: Cannabinoid and Opioid Receptor Heteromers. In *G-Protein-Coupled Receptor Dimers*, K. Herrick-Davis, G. Milligan, and G. Di Giovanni, eds. (Cham, Springer International Publishing), pp 173-206.
3. Cichewicz, D.L. (2004). Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics. *Life Sci* 74, 1317-1324.
4. Hajkova, A., Techlovská, S., Dvorakova, M., Chambers, J.N., Kumpost, J., Hubalkova, P., Prezeau, L., and Blahos, J. (2016). SGIP1 alters internalization and modulates signaling of activated cannabinoid receptor 1 in a biased manner. *Neuropharmacology* 107, 201-214.
5. Laughlin, S.B., and Sejnowski, T.J. (2003). Communication in Neuronal Networks. *Science* 301, 1870-1874.
6. Di Maio, V. (2008). Regulation of information passing by synaptic transmission: A short review. *Brain research* 1225, 26-38.
7. Huang, Y., and Thathiah, A. (2015). Regulation of neuronal communication by G protein-coupled receptors. *FEBS Letters* 589, 1607-1619.
8. Miess, E., Gondin, A.B., Yousuf, A., Steinborn, R., Mosslein, N., Yang, Y., Goldner, M., Ruland, J.G., Bunemann, M., Krasel, C., et al. (2018). Multisite phosphorylation is required for sustained interaction with GRKs and arrestins during rapid μ -opioid receptor desensitization. *Sci Signal* 11.
9. Tobin, A.B. (2008). G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom. *British journal of pharmacology* 153 Suppl 1, S167-S176.
10. Fujita, W. (2015). Heteromers of μ - δ opioid receptors: new pharmacology and novel therapeutic possibilities. *British Journal of Pharmacology* 172.
11. KITTNAR, O. (2011). *Lékařská fyziologie*.
12. Yang, W., and Xia, S.H. (2006). Mechanisms of regulation and function of G-protein-coupled receptor kinases. *World J Gastroenterol* 12, 7753-7757.
13. Pierce, K.L., Premont, R.T., and Lefkowitz, R.J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 639-650.
14. Jain, R., Watson, U., Vasudevan, L., and Saini, D.K. (2018). Chapter Three - ERK Activation Pathways Downstream of GPCRs. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, A.K. Shukla, ed. (Academic Press), pp 79-109.

15. Eishingdrelo, H., and Kongsamut, S. (2013). Minireview: Targeting GPCR Activated ERK Pathways for Drug Discovery. *Curr Chem Genom Transl Med* 7, 9-15.
16. Smith, J.S., and Rajagopal, S. (2016). The beta-Arrestins: Multifunctional Regulators of G Protein-coupled Receptors. *J Biol Chem* 291, 8969-8977.
17. Cahill, T.J., 3rd, Thomsen, A.R.B., Tarrasch, J.T., Plouffe, B., Nguyen, A.H., Yang, F., Huang, L.-Y., Kahsai, A.W., Bassoni, D.L., Gavino, B.J., et al. (2017). Distinct conformations of GPCR- β -arrestin complexes mediate desensitization, signaling, and endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, 2562-2567.
18. Kenakin, T. (2019). Biased Receptor Signaling in Drug Discovery. *Pharmacological Reviews* 71, 267-315.
19. Grundmann, M., Merten, N., Malfacini, D., Inoue, A., Preis, P., Simon, K., Rüttiger, N., Ziegler, N., Benkel, T., Schmitt, N.K., et al. (2018). Lack of beta-arrestin signaling in the absence of active G proteins. *Nature communications* 9, 341-341.
20. Calebiro, D., and Godbole, A. (2018). Internalization of G-protein-coupled receptors: Implication in receptor function, physiology and diseases. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 32, 83-91.
21. Nogueras-Ortiz, C., and Yudowski, G.A. (2016). The Multiple Waves of Cannabinoid 1 Receptor Signaling. *Mol Pharmacol* 90, 620-626.
22. Sorkin, A., and von Zastrow, M. (2009). Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 609-622.
23. Barbieri, E., Di Fiore, P.P., and Sigismund, S. (2016). Endocytic control of signaling at the plasma membrane. *Current Opinion in Cell Biology* 39, 21-27.
24. Calebiro, D., Nikolaev, V.O., Persani, L., and Lohse, M.J. (2010). Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 31, 221-228.
25. Hua, T., Vemuri, K., Pu, M., Qu, L., Han, G.W., Wu, Y., Zhao, S., Shui, W., Li, S., Korde, A., et al. (2016). Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB1. *Cell* 167, 750-762 e714.
26. Muralidhar Reddy, P., Maurya, N., and Velmurugan, B.K. (2019). Medicinal Use of Synthetic Cannabinoids—a Mini Review. *Current Pharmacology Reports*.
27. O'Sullivan, S.E. (2016). An update on PPAR activation by cannabinoids. *British journal of pharmacology* 173, 1899-1910.
28. Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., and De Petrocellis, L. (1998). Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends in Neurosciences* 21, 521-528.

29. Morales, P., Goya, P., Jagerovic, N., and Hernandez-Folgado, L. (2016). Allosteric Modulators of the CB1 Cannabinoid Receptor: A Structural Update Review. *Cannabis Cannabinoid Res* 1, 22-30.
30. Tibiriça, E. (2010). The multiple functions of the endocannabinoid system: a focus on the regulation of food intake. *Diabetology & metabolic syndrome* 2, 5-5.
31. Zou, S., and Kumar, U. (2018). Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *International journal of molecular sciences* 19, 833.
32. Sam, A.H., Salem, V., and Ghatei, M.A. (2011). Rimonabant: From RIO to Ban. *Journal of obesity* 2011, 432607-432607.
33. Reisine, T., Law, S.F., Blake, A., and Tallent, M. (1996). Molecular mechanisms of opiate receptor coupling to G proteins and effector systems. *Ann N Y Acad Sci* 780, 168-175.
34. Pasternak, G.W., and Pan, Y.X. (2013). Mu opioids and their receptors: evolution of a concept. *Pharmacol Rev* 65, 1257-1317.
35. Brownstein, M.J. (1993). A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5391-5393.
36. Trevaskis, J., Walder, K., Foletta, V., Kerr-Bayles, L., McMillan, J., Cooper, A., Lee, S., Bolton, K., Prior, M., Fahey, R., et al. (2005). Src homology 3-domain growth factor receptor-bound 2-like (endophilin) interacting protein 1, a novel neuronal protein that regulates energy balance. *Endocrinology* 146, 3757-3764.
37. Zhang, Y., Feng, Y., Xin, Y., and Liu, X. (2018). SGIP1 dimerizes via intermolecular disulfide bond in muHD domain during cellular endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 505, 99-105.
38. Hollopeter, G., Lange, J.J., Zhang, Y., Vu, T.N., Gu, M., Ailion, M., Lambie, E.J., Slaughter, B.D., Unruh, J.R., Florens, L., et al. (2014). The membrane-associated proteins FCHO and SGIP are allosteric activators of the AP2 clathrin adaptor complex. *Elife* 3.
39. Uezu, A., Horiuchi, A., Kanda, K., Kikuchi, N., Umeda, K., Tsujita, K., Suetsugu, S., Araki, N., Yamamoto, H., Takenawa, T., et al. (2007). SGIP1 α Is an Endocytic Protein That Directly Interacts with Phospholipids and Eps15. *Journal of Biological Chemistry* 282, 26481-26489.
40. Al-Zoubi, R., Morales, P., and Reggio, P.H. (2019). Structural Insights into CB1 Receptor Biased Signaling. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 1837.
41. Benyhe, S., Zádor, F., and Otvos, F. (2015). Biochemistry of opioid (morphine) receptors: Binding, structure and molecular modelling.

Porovnání proteinových sekvencí receptorů CB1R a MOR

CB1R	1	MKSILDGLADTTTFRITITTDLLLYVGSNDIQYEDIKGDMSKLGYPQKFPL	50
MOR	1	-----	0
CB1R	51	TSFRGSPFQEKMTAGDNPQLVPADQVNITE--FYNK-----SLS	87
MOR	1	-----DSSAAPTNASNCTDALAYSSCSPAPSPGSWVNL	34
CB1R	88	SFKENEENIQCGENFMDIE-----CFMVLNPSQQLAIAVLSL-----TLG	127
MOR	35	HLDGNLSD-PCGPNRTDLGGRDRLCPPTGSPSMITAITIMALYSIVCVG	83
CB1R	128	TFTVLE ^{NLLV} LCVILHSRSLRCRPSYHFIGS ^{LAVAD} LLGSVIFVYSFIDF	177
MOR	84	LF-- ^{G^{NFLV}} MYVIVRYTKMKATNI-YIFN ^{LALAD} ALATSTLPFQSVNY	129
CB1R	178	-----HVFHRKDSRNVFLFKLGGVTASFTASVGSFLFLTAI ^{DRY}	215
MOR	130	LMGTWPFGTILCKIVISIDYYNMF-----TSIFT-----LCTMSV ^{DRY}	167
CB1R	216	ISIHRLPLAYKRIVTRPKAVVAFCLMWTTIAIVIAVLPLL-----	253
MOR	168	IAVCHPVKALDFRTPRNAKIINVCNWILSSAIG-LPVMFMATTKYRQGS	216
CB1R	254	-----GWNCEKLQSVCSDFPHIDETYLMFWIGVTSVLLLFIVYAY	294
MOR	217	DCTLTFSHPWTWYENLLKICVFIFAFI-----MPVLIITVCYGL	255
CB1R	295	MYILWKAHSHAV ^{VRMI} ^Q RGT ^Q KS ^{II} IHT ^{SE} DGKVQVTRPDQARMDIRLAKT	344
MOR	256	^{MILRLK} ---- ^{SVRMLSGS} KEK----- ^{DRNL} R-----RITRM	282
CB1R	345	LVLILVVLII ^{CWGF} LLAIMVYDVF ^G KMNKLIKTVFA-----FCSMLCLLN ^N	389
MOR	283	VLVVVAVFIV ^{CWTP} ---IHIYVIAKALVTIPETTFQTVSWHFCIALGYTN ^N	329
CB1R	390	^{STVN} ^{PIIY} ALRSKDLRHAFRSMFPCSCEGT ^{AQPLDNSMGDS} DC----- ^{LH}	433
MOR	330	^{SCLNPVLY} AFLDENFKRCFREF----- ^{AQPTSSNIEQQNSTRIRQ} NTR	372
CB1R	434	^{KHANNAASVHRA} --- ^{AESCIKSTVKIAKVTMSVSTD} TSAEAL	472
MOR	373	^{DHPSTANTVDRTNHOLENLEAETAPLP} -----	399

Poznámka: Proteinová sekvence MOR je uvedena včetně mutace izoleucinu na valin